

h: 252

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier

PAR

Pour obtenir le Diplôme de Docteur de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

JURY : MM. HOLLANDE, Professeur, *Président*.
ASTRUC, Doyen, Professeur.
MOUSSERON, Professeur. } *Assesseurs.*

MONTPELLIER
IMPRIMERIE DE LA CHARITE
(Pierre-Rouge)

1936

**La réaction chromo-osmique
pour la détection des lipides
en histologie**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DE PHARMACIE

La réaction chromo-osmique pour la détection des lipides en histologie



THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier

Le Mai 1936

PAR

Mlle M. PLAINECASSAGNE

Pour obtenir le Diplôme de Docteur de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

JURY : MM. HOLLANDE, Professeur, *Président*.
ASTRUC, Doyen, Professeur.
MOUSSERON, Professeur. } *Assesseurs.*

MONTPELLIER
IMPRIMERIE DE LA CHARITÉ
(Pierre-Rouge)

1936

Faculté de Pharmacie de Montpellier

MM.

ADMINISTRATION

A. ASTRUC (O. ✱. I. P. ☉)	Doyen.
A. JUILLET (I. P. ☉)	Assesseur.
LEBLAYE (A. ☉)	Secrétaire.

MM.

PROFESSEURS

A. ASTRUC (O. ✱. I. P. ☉)	Pharm. galénique et industrielle.
C. HOLLANDE (I. P. ☉)	Zoologie et microbiologie.
A. JUILLET (I. P. ☉)	Botanique et matière médicale.
A. FAUCON (O. ✱. I. P. ☉, ☼, C. ✱, G. O. ✱)	Pharmacie chimique.
E. CANALS (I. P. ☉)	Physique.
M. MOUSSERON	Chimie organique.
P. JAULMES. Chargé du Cours	Analyse et Toxicologie.
E. CANALS (I. P. ☉) Chargé du Cours	Chimie minérale.



DOYEN HONORAIRE

M. G. MASSOL (✱, I. P. ☉)

M.

PROFESSEUR HONORAIRE

F. JADIN (O. ✱. I. P. ☉). Doyen hon. de la Faculté de Pharm. de Strasbourg.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES ET AUXILIAIRES

MM.

A. ASTRUC (O. ✱. I. P. ☉)	Hydrologie.
C. HOLLANDE (I. P. ☉)	Zoologie.
A. JUILLET (I. P. ☉)	Botanique.
A. FAUCON (O. ✱. I. P. ☉, ☼, C. ✱, G. O. ✱)	Fonctions en chimie organique.
M. MOUSSERON	Chimie biologique.
P. JAULMES	Toxicologie.
MOYE, Doyen hon. Fac. de Droit (✱. I. P. ☉)	Législation pharmaceutique.

AGRÉGÉ

M. P. CASTEL, chargé d'Agrégation

MM.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

L. FARRÉ (I. P. ☉)	Chimie et Pharmacie.
DAUBIAN DELISLE (✱, I. P. ☉)	Physique.
SUSPLUGAS	Histoire naturelle.

NOTA. — La Faculté de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui lui sont présentées.

A LA MÉMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

En témoignage de mon affection et de
ma profonde reconnaissance.

A TOUS MES AMIS

M. P.

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR HOLLANDE

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Montpellier

A MONSIEUR LE DOYEN ASTRUC

Professeur de Pharmacie galénique et industrielle à la
Faculté de Pharmacie de Montpellier

Officier de la Légion d'Honneur

Membre correspondant de l'Académie de Médecine

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MOUSSERON

Professeur de Chimie organique à la Faculté de Pharmacie

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE MONTPELLIER

AVANT-PROPOS

Nous sommes heureuse, avant de présenter ce modeste travail, d'adresser à notre maître Monsieur le Professeur HOLLANDE, le témoignage de notre vive gratitude ; nous n'oublierons jamais qu'il n'a cessé de nous guider et de nous encourager au cours de notre travail.

Qu'il trouve ici l'assurance de notre profonde et sincère reconnaissance.

Nos remerciements vont également à Monsieur le Doyen ASTRUC, qui nous fait aujourd'hui le grand honneur de siéger au jury de notre thèse. Nous nous souviendrons toujours de ses précieux enseignements. Nous sommes heureuse de l'assurer de notre très vive reconnaissance.

Auprès de Monsieur le Professeur MOUSSERON, nous avons toujours trouvé le plus bienveillant accueil. Nous le remercions d'avoir bien voulu accepter de faire partie du jury qui doit examiner le présent travail, c'est un honneur auquel nous sommes très sensible.

C'est pour nous une grande joie de dire ici à Madame HOLLANDE, chef des Travaux pratiques de Bactériologie, toute notre reconnaissance et notre profond et respectueux attachement.

Pendant notre séjour au laboratoire elle n'a cessé de s'intéresser à nos travaux et de nous conseiller toujours avec la plus grande bienveillance. Nous l'en remercions bien vivement.

Qu'il nous soit permis en terminant d'adresser un hommage reconnaissant à tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie.

M. P.

SOMMAIRE

Introduction et aperçu historique	13
a) Acide osmique	15
b) Colorants histologiques des lipides	19
c) Réactions chimiques	23

CHAPITRE PREMIER

Techniques et Méthodes	29
A) <i>Réaction du mélange chromo-osmique (réaction témoin).</i>	30
B) <i>Contrôle de la réaction du mélange chromo-osmique.....</i>	31
1 ^o Coloration au Soudan III	31
2 ^o Coloration au bleu B Z L	32
3 ^o Imprégnation osmique directe	33
C) <i>Réactions cytologiques, dites spécifiques de certaines classes de lipides</i>	33
1 ^o Méthode de CIACCIO.....	34
2 ^o Méthode de SMITH DIETRICH	35
3 ^o Recherche du cholestérol par la réaction de LIEBERMANN	35
4 ^o Réaction de ROMIER	36
5 ^o Détection des stérols libres	36
D) Analyse de la réaction du mélange chromo-osmique.	37

CHAPITRE II

Essais des différentes techniques et méthodes	41
I. — Mise en évidence des lipides dans les cellules par l'action osmio-réductrice	41
A) Intestin moyen de <i>Anguilla vulgaris</i> TURTON ...	42
a) Lavage à l'eau formolée (réaction témoin).	
b) Lavage à l'eau courante.	
B) Foie de <i>Anguilla vulgaris</i> TURTON	49
a) Lavage à l'eau formolée (réaction témoin).	
b) Lavage à l'eau courante.	
C) Ovaire du lapin	50
a) Lavage à l'eau formolée (réaction témoin).	
b) Lavage à l'eau courante.	
D) Chenilles de <i>Pieris brassicae</i> L.	51
a) Lavage à l'eau formolée (réaction témoin).	
b) Lavage à l'eau courante.	
II. — Etude de la réaction osmio-réductrice	56
A) Observations faites avec le liquide fixateur de BOUIN-HOLLANDE modifié	56
A') Action du formol	56
1 ^o Action de l'eau formolée après un lavage à l'eau courante (étudiée parallèlement à la réaction témoin).	57
2 ^o Suppression du formol dans le fixateur et l'eau de lavage des pièces	59
3 ^o Action du BOUIN-HOLLANDE après un lavage à l'eau courante	60
III. — Observations faites avec divers liquides fixateurs ...	62
I. Essais avec le liquide de BOUIN trichloracétique ...	62
II. Essais avec le sublimé à saturation à chaud dans le liquide physiologique à 7 gr. 50 de chlorure de sodium p. 1000	65
III. Essais avec le liquide de FLEMMING fort	65
IV. Essais avec le liquide chromo-osmique seul	67
V. Essais de fixation par le BOUIN cuprique sans formol, additionné du mélange chromo-osmique.	68
IV. — Résultats comparatifs fournis par la méthode de CIACCIO et la fixation au BOUIN cuprique, mélange chromo-osmique (réaction témoin)	69

V. — <i>Contrôle de la réaction témoin au moyen de quelques colorants spécifiques des lipides : Soudan III, bleu de Nil, bleu B Z L</i>	70
1 ^o Coloration post-vitale sur l'intestin de l'anguille J avec le Soudan III et le bleu B Z L	70
2 ^o Coloration par le bleu B Z L, sur les coupes de tissus fixés au formol salé, obtenues au microtome à congélation	71
3 ^o Comparaison entre les résultats fournis par les colorations au Soudan III, au bleu B Z L, et l'action réductrice du liquide chromo-osmique.	73
4 ^o Modifications apportées à la coloration par le Soudan III en vue d'éviter la cristallisation du colorant sur les coupes	77
VI. — <i>Remarques au sujet de la différenciation histochimique des lipides réduisant l'acide osmique</i>	81
Recherche du cholestérol :	
a) Réaction de LIEBERMANN	81
b) Localisation histochimique du cholestérol (méthode de ROMIEU)	82
c) Réaction à la digitonine	82

CHAPITRE III

Application de la méthode chromo-osmique à la réaction du cancer de Max Aron sur la cortico-surrénale du lapin	83
I. — <i>Indication des recherches de Max ARON</i>	83
II. — <i>Méthode d'extraction du principe urinaire</i>	85
III. — <i>Technique de fixation et de coloration de la surrénale suivant ARON</i>	86
IV. — <i>Observation I</i>	87
1). Réaction « du cancer » suivant ARON	87
2) Interprétation des coupes	88
A) Capsule surrénale prélevée à la biopsie	88
a) Coloration au Soudan III, au bleu B Z L et action du mélange chromo-osmique sur les coupes effectuées à congélation.	88
b) Fixation au BOUIN-HOLLANDE, imprégnation chromo-osmique	90

B) Examen des coupes de la surrénale prélevée après l'autopsie du lapin ayant reçu les injections d'extrait urinaire	90
a) Fixation au formol salé ; colorations au Soudan III, bleu B Z L, et imprégnation chromo-osmique effectuées sur les coupes obtenues à congélation	90
b) Fixation au cuprique trichloracétique 48 heures, imprégnation chromo-osmique après lavage de 24 heures à l'eau formolée à 3 p. 100	90
c) Fixation au Zenker-formol	91
C) Réaction sur l'ovaire	91
V. — <i>Observation II</i>	91
1) Réaction du cancer	91
2) Interprétation des coupes	91
A) Capsule surrénale prélevée à la biopsie	92
a) Fixation au formol salé, coloration au Soudan III, au bleu B Z L, et imprégnation chromo-osmique	92
b) Fixation au BOVIN-HOLLAND (réaction témoin)	92
B) Examen des coupes de la surrénale prélevée après l'autopsie du lapin ayant reçu les injections d'extrait urinaire	93
a) Coloration au Soudan III, bleu B Z L, imprégnation chromo-osmique sur les coupes effectuées à congélation	93
b) Fixation au cuprique trichloracétique, lavage à l'eau formolée, imprégnation chromo-osmique	93
c) Fixation au Zenker-formol	93
C) Réaction sur l'ovaire	93
<i>Conclusions</i>	93
<i>Conclusions générales</i>	95
<i>Bibliographie</i>	99

INTRODUCTION ET APERÇU HISTORIQUE

En histologie, le chapitre des corps gras renferme « de nombreux documents » comme l'indique LISON ; il est cependant loin de constituer un ensemble achevé de connaissances définitivement acquises. Les méthodes proposées pour la détection des lipides sont nombreuses, cependant beaucoup d'entre elles nécessitent des réserves et il en est très peu qui soient vraiment spécifiques.

La présence « des corps gras » dans le protoplasme sous la forme figurée de corpuscules brillants, à contours plus ou moins arrondis, est connue depuis longtemps.

Parmi ces corpuscules les uns sont très solubles dans les solvants des corps gras, les autres résistent plus ou moins longtemps à l'action de certains de ces solvants. Il y a donc des différences marquées entre les diverses inclusions. En outre, les corps gras de la cellule ne se présentent pas tous sous la forme figurée ; il existe des combinaisons certaines entre les protéines et divers lipides.

Il nous suffira à ce sujet de rappeler qu'OVERTON (1900) étudiant la perméabilité des cellules pour certaines substances fut un des premiers à attirer l'attention sur l'importance des lipides non figurés. Au point de vue cytophysiologique, il admet que, localisés à la membrane cellulaire ou « périplaste », ceux-ci rendent la cellule perméable à certains produits solubles dans les solvants des corps gras.

Pour KANITZ, le périplaste ne serait pas uniquement formé

de lipides ; de plus ces derniers se trouveraient répartis dans tout le protoplasme de la cellule.

C'est ce qu'ont mis en évidence les travaux récents de JAVILLIER, ALLAIRE et Mlle ROUSSEAU (1927) ; pour ces auteurs, le tiers de la substance animale sèche est constitué par des substances solubles dans l'alcool et l'éther. MACHEBŒUF (1921) arrive à de semblables résultats ; il conclut que dans le protoplasme existent de très notables quantités de phospholipides, de glycérides et de stérols libres ou éthérifiés.

KUTSCHERA et AICHBERGEN (1) ont montré que si l'on traite par l'acétone des coupes à congélation de tissus non fixés, contenant de la graisse figurée sous la forme de gouttelettes, elles perdent leur colorabilité par tous les réactifs spécifiques des corps gras, alors qu'elles renferment encore une notable quantité de graisse que l'on peut mettre en évidence par des extractions successives à l'alcool et à l'éther.

Il existe donc dans les cellules des graisses visibles, figurées sous la forme de granules brillants sphériques ou d'inclusions à contours divers et d'autres invisibles, « masquées », non décelables par les réactifs histologiques habituels. De plus, certains organites préformés, tels les éléments constitutants du chondriome, peuvent résulter d'une combinaison ou d'une adsorption de matière protéique et de substances lipides (REGAUD, MAYER, SCHAEFFER, etc.).

Les histologistes ont cherché, au début, à mettre en évidence les diverses inclusions lipiques contenues dans le protoplasme des cellules, puis à les colorer spécifiquement afin de les différencier si possible les unes des autres ; en dernier lieu, ils ont cherché à « démasquer » les lipides invisibles.

Un très grand nombre de techniques ont été proposées à cet effet ; elles sont loin d'avoir une égale valeur.

Il importe avant d'en rappeler les principes, de mentionner les divers lipides que l'on rencontre dans les cellules.

Abandonnant le terme de « lipoides » servant à définir cer-

(1) KUTSCHERA et AICHBERGEN. Cité d'après ROMEIS : *Taschenbuch der. mikroskopischen Technik*, 1928. paragr. 827. p. 257.

tains corps « présentant de grandes analogies avec les graisses », nous prendrons comme classification des lipides des cellules celle proposée par LISON (1933) et que nous résumons ainsi :

- | | | |
|----------------------------|---|--|
| Lipides
des
cellules | { | I Glycérides (graisse neutre) glycérol avec acide gras. |
| | | II Cholestérides ou stérides (Esters du cholestérol).
= cholestérine estérifiée par un'acide gras). |
| | | III Lipides complexes (anciennement lipoïdes :
Phospholipides (phosphatides).
Galactolipides (cérébrosides). |

Pour la détection de ces divers lipides figurés, l'histologie a mis en œuvre de nombreuses méthodes utilisant surtout la réduction de l'acide osmique au contact de certains corps gras et la propriété qu'ont certains colorants de se dissoudre dans divers corps gras.

Diverses réactions histochimiques ont été également préconisées.

a) Acide osmique.

Ce composé de formule $Os O_4$, est un réactif très employé pour la mise en évidence des lipides dans la cellule. On ne peut guère l'envisager comme un oxyde acide. En effet, il ne présente pas les propriétés caractéristiques d'un acide ; il ne fait pas virer le tournesol ; on n'en a pas obtenu des sels et sa solution potassique en abandonne la majeure partie par distillation, le surplus se dédoublant en osmite de potassium et oxygène.

Rappelons que l'on obtient ce tétroxyde d'osmium par le grillage de l'osmiure d'irridium ou de l'osmium qui chauffé au rouge sombre dans un courant d'oxygène se transforme complètement en anhydride osmique. Il est très volatil et émet des vapeurs à la température ordinaire, vapeurs qui sont dangereuses à respirer.

C'est un oxydant très énergique, des traces de matières organiques suffisent pour le réduire très rapidement.

Pour cette raison les solutions d'acide osmique doivent être

effectuées avec de l'eau pure. On utilise habituellement des solutions aqueuses à 1 ou 2 %.

P. MAYER recommande d'ajouter à 100 cm³ de ces solutions dix gouttes d'une solution de sublimé à 5 % afin d'éviter la réduction.

L'acide osmique a été introduit dans la microtechnique par BRAUELL (1849) ; mais ce sont surtout MAX SCHULTZE et RUDNEFF (1865) qui ont attiré l'attention des histologistes sur ce produit.

Comme l'ont constaté ces auteurs le peroxyde d'osmium est réduit par un certain nombre de corps gras. L'étude de cette réduction a fait l'objet d'une multitude de recherches dont nous ne rapporterons ici que les principales.

ALTMANN (1894), constatant que certains globules graisseux ne se coloraient pas par l'acide osmique, effectue des analyses microchimiques afin de déterminer la nature des corps gras produisant cette réduction. Il conclut que seuls, l'acide oléique et la trioléine sont noircis d'une manière sensible par ce réactif.

A la même époque, UNNA (1894), à la suite de recherches analogues, constate que les acides oléique, stéarique, palmitique, réduisent le tétr oxyde d'osmium, ces derniers étant maintenus à l'état de fusion.

STARKE, en 1895, observe le premier qu'il se produit deux sortes de réduction de l'acide osmique ; l'une dite « réduction primaire » qui s'effectue immédiatement et au contact direct de certains corps gras, l'autre, dite « réduction secondaire » qui ne se produit qu'en présence de l'alcool.

Reprenant cette étude *in vitro*, avec les acides oléique, palmitique, HANDWERK (1898) croit que cette réduction secondaire signalée par STARKE serait due à une hydratation, sous l'action de l'alcool, de $Os O^4$ en $Os (OH)^4$.

MICHAELIS (1901) attribue la réduction de $Os O^4$ par l'acide oléique à une oxydation de ce dernier ; il y aurait en effet, pour BRISTOLL, transformation de $Os O^4$ en $Os O^2$; par action de l'eau oxygénée on obtiendrait à nouveau $Os O^4$.

NEYBAUER (1902) a également étudié l'action du tétr oxyde d'osmium ; il en a fait un réactif des corps gras à double ou à

triple liaison, car il constate que les acides gras saturés n'ont aucune action sur ce corps.

MULON (1904) arrive, après une série de travaux, aux mêmes conclusions que NEUBAUER. Il indique que l'action de l'acide osmique sur les graisses est la résultante d'un double phénomène : chimique (réduction) et physique (adsorption).

Après UNNA, MULON constate qu'une graisse chimiquement pure et cristallisée, en présence d'acide osmique ne donne pas de coloration au microscope ; la réduction de Os O^4 se fera peut-être, mais il ne se produira pas de dépôt de particules d'osmium à l'intérieur du cristal ; si, au contraire, la graisse est fondue, elle se colorera pas Os O^4 , mais redeviendra incolore par recristallisation, avec dépôt d'osmium réduit, à côté des cristaux ; ces résultats ont été obtenus avec la trioléine.

MULON en conclut que « la coloration de la graisse n'est pas due à une combinaison colorée, mais à un mélange de molécules graisseuses oxydées, incolores, et de particules d'osmium libéré ». Étant donné qu'en général, aucune des graisses de l'organisme vivant n'est cristallisée, elles sont toutes miscibles à l'osmium réduit, donc colorables.

Les différentes graisses se colorent inégalement par imprégnation osmique (48 heures en solution à 2 %) ; MULON attribue les variations dans la colorabilité des graisses à la composition chimique de ces corps. Les graisses neutres sont des éthers de la glycérine et d'acide gras ; dans quelques cas, ajoute MULON, d'autres acides interviennent pour éthérifier une des fonctions alcools de la glycérine (par exemple, l'acide phosphorique pour la lécithine), or ni la glycérine, ni l'acide phosphorique ne réduisent Os O^4 ; il en résulte que l'action réductrice de ces corps doit être attribuée aux acides gras.

MULON a étudié *in vitro*, l'action du tétroxyde d'osmium sur les différents acides gras ; il a ainsi constaté avec les acides saturés : butyrique, valérique, caproïque, caprylique, laurique, qu'il n'obtenait aucune réduction ; avec les acides palmitique, stéarique, ou leurs éthers (tripalmitine et tristéarine) il a noté une très légère action se traduisant au microscope par une faible coloration bistre devenant noire par passage dans les alcools.

Par contre avec les acides non saturés en $C^4 H^{2n-2} O^2$, tels que l'acide oléique et son éther la trioléine fluide, il obtient une coloration noir intense ; il l'explique par la structure moléculaire de ce corps : l'acide oléique est un acide gras non saturé possédant une liaison éthylénique avide d'oxygène.

D'autres acides, de la même série (acide crotonique, angélique, crucique) produisent une réduction analogue ; il en est de même pour les acides linoléique, ricinoléique à deux liaisons éthyléniques.

Quant à la légère réduction du peroxyde d'osmium, obtenue avec les acides palmitique, stéarique ou leurs triglycérides, MULON l'attribue à une impureté réductrice.

Les graisses animales ne sont jamais pures, les stéarines et les palmitines prendront la teinte bistre, les oléines la teinte noire : MULON a pu constater en faisant agir $Os O^4$ sur divers mélanges que « pour que la teinte noire se produise d'emblée, il fallait qu'il y eût au moins 50 % d'oléine dans le mélange ; les lécithines qui ne renferment qu'un tiers en poids d'oléine ne se coloreront jamais en noir, mais en bistre ; ce ton pourra être plus accentué pour certaines lécithines dont la base est la névrine, car celle-ci est une amine à fonction éthylénique et se trouve par conséquent douée théoriquement d'un pouvoir réducteur ; au contraire les lécithines contenant de la choline, qui est une amine alcool, seront moins colorables. »

Divers mélanges fixateurs à base d'acide osmique ont été utilisés ; ce sont : les mélanges de FLEMMING ou chromo-acéto-osmique (1884), mais ils ne peuvent être employés que pour de très petits objets ou de très petits fragments d'organes, malgré ce la partie utilisable est très mince, à cause des phénomènes de surfixation ou action périphérique (FISCHER, MANN, VON TELLYESNIZKY).

Il en est de même avec les mélanges de : VON RATH (1895), picro-acéto-osmique ; d'ALTMANN, 1894, ou platino-acéto-osmique (1889) ; de CHAMPY (1911), (Bichromate de potassium à 3 p. 100 7 parties, acide chromique à 1 p. 100 7 parties, acide osmique à 2 p. 100 4 parties).

La pénétration de ces divers liquides est très faible et très

irrégulière. Ils ne permettent la fixation que de très petits fragments dont les couches les plus externes sont seules utilisables.

b) Colorants histologiques des lipides.

Pour la mise en évidence des lipides dans la cellule, on a utilisé, outre l'osmium, de nombreux colorants naturels ou dérivés des produits de l'aniline.

Nous indiquerons d'abord les essais effectués avec les colorants dits spécifiques des graisses ; nous exposerons rapidement un certain nombre d'indications se rapportant aux nombreuses et diverses substances essayées à cet effet.

En premier lieu, on doit signaler, comme colorant spécifique des graisses, le Soudan III ; il a été introduit dans la technique histologique par DADDI en 1896.

Cet auteur, après avoir nourri pendant plusieurs jours des lapins, des cobayes, des pigeons, avec de l'huile colorée par du Soudan III, constate que le tissu adipeux de ces animaux s'est teinté en rouge, alors que les autres tissus et viscères sont demeurés incolores.

A la suite de cette observation, DADDI songea à utiliser l'affinité tinctoriale du Soudan vis-à-vis des graisses, pour la mise en évidence de ces dernières dans les différents tissus animaux.

DADDI mentionne les diverses propriétés du Soudan III ; il indique qu'il est insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, le xyloï, les huiles essentielles de bergamote, de girofle, de cèdre, de térébenthine, l'huile d'aniline, les graisses neutres et les acides gras.

Sa méthode de coloration est la suivante : il fixe les organes dans le liquide de Müller, effectue les coupes à congélation pour éviter l'inclusion à la paraffine, et par suite la dissolution des graisses, et les colore de cinq à dix minutes dans une solution saturée de Soudan dans l'alcool éthylique à 70° ; seule la graisse est colorée en jaune orange.

RIEDDER (1897), fixe au formol ou au Bouin et, sur les coupes à congélation lavées à l'alcool à 50°, effectue une coloration au Soudan III.

COLIN (1899) emploie ce colorant, après fixation au formol, et lui associe un colorant plasmatique.

SATA (1900) et FISCHER (1902) donnent de même des indications sur la coloration au Soudan combinée avec un autre colorant.

MICHAELIS indique, en 1901, la constitution chimique du Soudan III : c'est un colorant tétrazoïque azo-benzène β naphтол ; l'oxhydrile OH est en position ortho dans le groupe azo du noyau naphтолénique ; seule interviendrait pour la coloration des graisses la position de l'oxhydrile dans le groupe azo.

D'autre part, pour MICHAELIS, le mécanisme de la coloration varierait avec la nature des graisses : dans le cas des graisses neutres, il y aurait un processus purement physique de dissolution en rapport avec la forme de la molécule du colorant ; dans le cas des acides non saturés, il s'agirait d'un processus chimique d'oxydation comparable à celui du peroxyde d'osmium.

CIACCIO (1909) utilise la coloration au Soudan pour la caractérisation d'une classe déterminée de lipides. Dans sa méthode, il insolubilise à 37° par un liquide fixateur à base de bichromate de potassium certains corps gras qu'il met ensuite en évidence sur les coupes par une coloration au Soudan. D'après l'auteur la vitesse d'insolubilisation varie avec la nature du lipoïde considéré, mais une chromisation de huit jours insolubilise intégralement tous « les lipoïdes » à l'exclusion des autres corps gras.

Ces résultats ont été contestés par plusieurs auteurs qui ont constaté que la chromisation insolubilise non seulement les « lipoïdes », mais encore les acides gras à caractère non saturé.

FAURÉ-FRÉMIET, MAYER et SCHAEFFER (1910) obtiennent par le Ciaccio la coloration des gouttelettes d'acides gras de la série non saturée.

KAUFFMANN et LEHMANN (1) (1926) nient la valeur des

(1) Cité d'après LISON : *Bulletin d'histologie appliquée*, n° 9, novembre 1933.

résultats de CIACCIO et pensent que la chromisation « n'insolubilise pas entièrement les « lipoïdes », mais encore insolubilise plus de la moitié des « non lipoïdes » non saturés ».

En réalité on doit être d'une grande prudence dans l'interprétation des résultats fournis par la réaction de CIACCIO.

BELL a utilisé, en 1914, une méthode analogue à celle de CIACCIO; il fixe au liquide de Tellyesniczky; les coupes faites, après inclusion à la paraffine, sont colorées au Soudan III dix minutes, les noyaux sont colorés à l'hémalum.

Cette méthode, d'après son auteur, permet de distinguer, les trioléines qui se présentent sous forme de gouttes annulaires, des lipoïdes qui paraissent des gouttes solides. Cette méthode serait préférable pour certains auteurs à celle de CIACCIO et voire même à celle de DIETRICH, dérivée du Ciaccio.

ROMEIS, en 1928, a proposé d'utiliser une solution de Soudan III faite à saturation à chaud dans l'alcool faible à 40°; il indique en outre que les solutions anciennes colorent moins bien que les solutions récentes.

HADJIOLOFF (1925) emploie une solution saturée à froid de Soudan III dans du savon liquide.

Après coloration au Soudan, on observe sur les coupes qu'il existe dans les cellules des gouttelettes grasses fortement colorées en rouge, en même temps que d'autres se teignent seulement en orangé pâle. Quelques auteurs ont voulu voir, dans cette différence de coloration, une indication se rapportant à la nature chimique de la substance mise en évidence, disant que les glycérides sont rouges, les cholestérides rose orangé, les « lipoïdes phosphorés » non colorés.

KAUFFMANN et LEHMANN ne reconnaissent aucune valeur à de telles indications et démontrent par l'expérimentation *in vitro* sur des corps gras et sur des mélanges de corps gras, que tous se colorent à peu près également à l'exception de deux acides gras saturés purs : acide palmitique, acide stéarique qui sont cristallisés à la température ordinaire et par suite sont de mauvais solvants.

Cette différence de coloration observée dans les techniques au Soudan sur les coupes à congélation effectuées après fixation

au formol ou au Bouin, ne doit être attribuée qu'à des variations d'ordre purement physique et non à la constitution chimique du corps gras. Comme l'avait déjà indiqué DADDI, le volume de la goutte suffit pour changer sa coloration.

Un colorant voisin du Soudan, le scarlach, donne des résultats en tous points comparables à ceux fournis par la coloration au Soudan III ; MICHAELIS (1901) a montré que le mécanisme en était le même.

HERSCHEIMER (1901-1903) l'utilise en solution alcoolique additionnée de Soude.

KIRCHENSKY (1902) démontre qu'il colore intensément les acides oléique, stéarique et palmitique, ainsi que leurs savons de soude et de potasse.

En résumé, le Soudan III et le scharlach ne permettent pas de distinguer les différents groupes de corps gras, mais ils n'en sont pas moins des colorants spécifiques de la classe des corps gras, eux seuls en effet donnent une réaction positive qui permet à l'histologiste d'affirmer qu'il est en présence d'une substance grasse.

LORAIN SMITH (1908) a cru voir dans la coloration au sulfate de bleu de Nil des tissus frais ou formolés et coupés à congélation, la possibilité de différencier les graisses neutres des acides gras.

Les premiers se coloreraient en rose tandis que les seconds prendraient une teinte bleue.

Du fait que dans les tissus les lipides se trouvent à l'état de mélange, à côté des nuances extrêmes rouges et bleues, il pourra exister toute une gamme de teintes violettes.

D'après les nombreux documents expérimentaux la concernant, cette réaction n'a pas la spécificité qu'on lui a attribuée au début. En particulier, KAUFFMANN et LEHMANN (1926) ont indiqué que, pour les mélanges de graisse où se trouvent en même temps un acide non saturé et un triglycéride non saturé, la coloration bleue de l'acide gras prédominera et masquera la coloration rose du glycéride.

On obtient une coloration bleue positive avec des mélanges de cholestérine et trioléine, de lécithine et trioléine, de glycérine

et trioléine. On ne peut rien conclure d'une coloration bleue ; seule la coloration rose pourra signifier : présence non exclusive d'un glycéride non saturé.

En outre d'un résultat négatif on ne pourra rien conclure.

Enfin, il ne faut pas oublier que le sulfate de bleu de Nil étant un colorant basique, il pourra colorer plus ou moins intensément certains éléments basophiles des tissus. LISON (1) vient du reste d'indiquer que le bleu de Nil était un mélange d'un colorant bleu basique et d'un colorant rouge ; seul ce dernier colorerait les graisses des cellules.

Signalons encore que certains colorants naturels permettent la détection des corps gras dans les cellules. Parmi ceux-ci, DIPPEL a recommandé, en 1883, l'emploi de la teinture d'Alkana ; ce colorant est insoluble dans l'eau, très soluble dans l'alcool, l'éther, le benzol, les paraffines, les graisses et les huiles essentielles.

P. GALESKO et S. BRATIANO (1928) ont employé un extrait alcoolique de carotte (le carotène) ; J. VERNE (1929) a obtenu de meilleurs résultats en utilisant les carotinoïdes constituant la zooérythrine des crustacés décapodes.

EISENBERG colore les graisses par une solution de chlorophylle dans l'acétone et l'alcool.

Aucun de ces colorants ne s'est montré supérieur au Soudan et au Scharlach.

c) Réactions chimiques.

Poussant plus loin l'analyse histochimique des corps gras, quelques auteurs ont tenté, par l'emploi de méthodes chimiques appropriées, d'effectuer la caractérisation, dans la cellule même — *in situ* en d'autres termes —, de divers lipides.

FISHLER, en 1904, a tenté de mettre en évidence les acides gras par leur insolubilisation à l'état de sels de cuivre ; il les caractérisait ensuite sur les coupes par l'action de l'hématoxyline

(1) *Compte Rendu Soc. Biol.*, 1935.

qui donne à leur niveau une laque cuivrique bleue. On doit faire preuve de beaucoup de réserve dans l'interprétation de cette méthode ; comme l'indique LISON, « l'hématoxyline donne des laques colorées au niveau de tous les composés métalliques ionisables à cation bi ou trivalent ».

KAUFFMANN et LEHMANN (1) ont indiqué qu'ils avaient obtenu des réactions Fishler positives avec des mélanges de corps gras où il n'existait aucune trace d'acides gras libres, et des réactions négatives avec des mélanges qui renfermaient des acides gras (cinq cas ont été observés).

SMITH DIETRICH (2) a mentionné une méthode pour la caractérisation des « lipoïdes ». Elle repose sur le principe suivant : traités par une solution de bichromate de potasse, les lipoïdes s'unissent au chrome de celui-ci en donnant un composé chromé, mis en évidence au moyen de l'hématoxyline qui forme à son contact une laque bleue noire résistant à la différenciation par le réactif de Weigert.

On a beaucoup discuté le mode d'action du bichromate de potasse au cours de cette réaction ; LISON pense que le composé formé est un composé d'adsorption.

D'après KAUFFMANN et LEHMANN (2), seule une coloration noir foncé doit être considérée comme positive, la teinte bleu-grise étant donnée par les mélanges gras les plus divers.

LISON indique d'autre part que l'on ne peut considérer un résultat positif comme caractéristique des lipines qu'à la condition d'exclure la présence de cholestérine ; un résultat négatif ne permet aucune conclusion. »

LOISEL a entrepris, en 1903, toute une série de réactions microchimiques afin de mettre en évidence les caractères différentiels entre les lécithines et les graisses neutres ; il indique ainsi que l'alcool à 90° dissout la lécithine d'autant plus vite qu'il est plus chaud alors que la même quantité de graisse résiste plus longtemps ; la lécithine résiste mieux après mordantage à l'alun

(1) Cité d'après LISON : *Bulletin d'histologie appliquée*, 1933, p. 237.

(2) Cité d'après ROMEIS : *Taschenbuch der mikroskopischen Technik*, 1928, paragr. 880-881, p. 270-271.

ou à l'acétate de cuivre ; le formol à la longue dissout la lécithine, n'agissant pas sur la graisse qu'il ne mouille pas.

Le liquide de Flemming colore en noir franc la graisse, la lécithine en gris jaunâtre. Pour l'éclaircissement des coupes, LOISEL préconise le xylol qui de tous les éclaircissants agit le plus lentement. Etudiant les colorants, LOISEL constate que le violet de gentiane, le violet cristal, le bleu de toluidine, la fuchsine acide, le vert de méthyle, l'orange G, l'indigo carmin, ne colorent pas ou peu les graisses neutres, tandis qu'ils colorent vivement la lécithine.

ROMIEU, en 1926, colore en brun acajou la lécithine par l'action d'une solution de Lugol après une légère hydrolyse acide obtenue par l'acide chlorhydrique à 10 % ; la réaction est due sans doute à la formation d'une iodocholine.

On a cherché également à caractériser histochimiquement, sur les coupes, le cholestérol et ses esters ; dans ce but, différents auteurs, SCHULTZE, ROMIEU (1925) ont repris la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD qu'ils ont appliquée, plus ou moins modifiée, à l'histologie. Cette réaction est d'ailleurs assez délicate à exécuter et altère facilement les tissus.

LISON indique qu'une réaction positive prouve la présence de cholestérol ou de ses esters ; mais une réaction négative, ne prouve pas leur absence.

WINDAUSS, 1909, met en évidence les stérols libres, et non leurs esters par la formation, en présence d'une solution alcoolique de digitonine, d'un complexe bien cristallisé de digitonine-stérol.

BRUNSWICK, le premier en 1922, puis LEULIER et REVOL (1930) ont appliqué cette réaction à l'histologie et ont obtenu des résultats précis.

Mentionnons, à la fin de cet exposé, qu'à côté des inclusions intraprotoplasmiques visibles de divers lipides, il existe, comme il a été dit plus haut, des lipides invisibles, non figurés, qui forment avec les albumines des complexes lipoprotidiques ; ces complexes présentent des propriétés qui diffèrent notablement de celles des corps gras libres.

Divers auteurs ont songé à démasquer les corps gras de tels

complexes. BIEDERMANN (1924) préconise ainsi l'action des enzymes digestion ; CIACCIO (1), celle d'agents chimiques divers. La plupart des auteurs s'accordent à penser que les résultats ainsi obtenus sont très insuffisants et même parfois de lecture difficile et douteuse.

D'après ce rapide exposé des recherches faites pour la caractérisation des différentes classes de lipides dans les cellules, nous voyons qu'il est souvent très difficile de déterminer leur nature chimique par la plupart des méthodes citées.

C'est à de semblables données qu'aboutit LISON qui a indiqué une méthode analytique qualitative de ces divers lipides, à laquelle nous renvoyons le lecteur. (Cf. LISON, *Bulletin d'histologie appliquée*, novembre 1933, t. X, p. 293.)

En résumé, en histologie, seules demeurent plus ou moins spécifiques des lipides — dénomination prise dans un sens très étendu — les colorations au Soudan et au Scharlach. Quant à la réduction du tétr oxyde d'osmium, bien que n'ayant pas de valeur spécifique, elle donne au point de vue morphologique des indications très précieuses.

Malheureusement le tétr oxyde d'osmium pénètre très difficilement les tissus. Dans une pièce fixée à l'acide osmique, le réactif ne se réduit qu'au niveau des gouttelettes de graisse situées dans les 3 ou 4 premières rangées de cellules. Son emploi comme détecteur des lipides en est de ce fait rendu très mal aisé.

Dans le présent travail, nous relatons les résultats que nous avons obtenus en utilisant le réactif de M. le Professeur HOL-LANDE, constitué par un mélange approprié d'acide osmique et d'acide chromique ; mélange que nous avons utilisé pour la détection des lipides à l'intérieur des tissus, même profondément situés.

(1) CIACCIO. Cité d'après LISON : *Bulletin d'histologie appliquée*, novembre 1933, t. X, p. 237.

Sans chercher à différencier les lipides entre eux, notre modeste but a été de conserver « dans la cellule », après fixation et montage des pièces à la paraffine, la morphologie des diverses inclusions lipidiques. Nous avons le plus souvent contrôlé nos résultats par l'action du Soudan III et du bleu BZL (Ciba), nouveau colorant des lipides, introduit récemment en histochimie par LISON (1933).

Dans un premier chapitre, nous indiquons les différentes techniques et méthodes que nous avons utilisées.

Dans un second chapitre, nous mentionnons les résultats que nous avons obtenus avec nos méthodes, sur diverses cellules animales.

Dans un troisième chapitre, nous avons appliqué la méthode au mélange chromo-osmique à la détection des lipides contenus dans les cellules dites spongiocytes de la cortico-surrénale du lapin, en nous conformant aux indications fournies par ARON, pour le diagnostic cytologique du cancer.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES ET MÉTHODES

Nous étant proposé d'étudier la pénétration de l'acide osmique à l'intérieur des tissus et son comportement vis-à-vis des lipides renfermés dans le protoplasme des cellules, nous indiquerons dans ce chapitre les différentes techniques et méthodes que nous avons utilisées à cet effet.

Nous dirons tout d'abord qu'en mélangeant l'acide osmique à des produits chimiques tels : le sublimé, le formol, les acides, etc., capables de coaguler les protéides, en utilisant les fixateurs classiques contenant de l'acide osmique, tels le Flemming, nous avons constaté, après bien d'autres auteurs il est vrai, que la réduction de l'acide osmique au contact des gouttelettes de la cellule, ne s'effectuait que dans les premières rangées de cellules. Si l'on prolonge d'autre part, le contact de l'acide osmique avec la pièce à fixer, on n'en augmente guère la pénétration ; mais on détermine un état de vitrification des cellules qui nuit ou empêche totalement parfois les colorations histologiques subséquentes.

Notre but, étant comme nous l'avons dit à la fin du chapitre précédent, d'obtenir une bonne pénétration de l'acide osmique dans les tissus à fixer, ainsi que sa réduction au contact des divers lipides des cellules, même profondément situées, nous avons, suivant les indications de Monsieur le Professeur HOLLANDE, opéré les manipulations en deux temps différents.

A) Réaction du mélange chromo-osmique.

Pour pratiquer cette réaction, nous fixons, durant un *premier temps*, les tissus mesurant au maximum un demi-centimètre de diamètre dans le liquide fixateur de BOUIN-HOLLANDE (1) pendant 24 à 48 heures ; nous lavons la pièce 24 heures dans l'eau distillée formolée à 3 p. 100 (flacon ERLLENMEYER de 125 cm³ dont l'eau formolée est changée 2, 3 fois durant les 24 heures), et la découpons, au moyen d'un rasoir, en tranches de deux millimètres à deux millimètres et demi d'épaisseur environ.

Dans un *deuxième temps*, nous plaçons les tranches fixées, dans le liquide chromo-osmique de HOLLANDE renfermant :

Acide osmique eu sol. aq. à 2 %/o	2 cm ³
Acide chromique en sol. aq. à 1 %/o	0 cm ³ , 1

Les pièces y demeurent 24 heures à la température du laboratoire, puis sont lavées à nouveau à l'eau formolée à 3 p. 100 durant 24 heures et finalement montées dans la série des alcools, toluène, paraffine.

Pour effectuer ce montage, il faut avoir soin de passer lentement d'un degré alcoolique à l'autre et laisser séjourner longtemps dans les alcools forts. En principe, nous opérons ce montage comme suit, au sortir de l'eau formolée : alcools successifs à 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 75°. Durée totale : 24 h. de l'alcool à 30° à l'alcool à 75° ; séjour de 24 h. dans l'alcool à 75° ; 12 heures dans chacun des alcools à 80° et 90° ; 24 heures dans l'alcool à 95° ; 12 heures dans l'alcool à 100° ; puis bains successifs de 12 h. dans l'alcool à 100° + toluène aa, toluène pur, toluène saturé à chaud de paraffine à 56°, paraffine à 56° (en deux bains différents 4 à 6 heures).

(1) Formule du BOUIN-HOLLANDE :

Eau distillée	100 cc.
Acétate neutre de cuivre	2 gr. 50
Acide picrique	4 gr.
Formol 40 %	10 cc.
Acide trichloracétique	0 gr. 75

Les coupes ont été effectuées à 3 μ et collées sur lame à l'aide de la colle au blanc d'œuf-carragahen de HOLLANDE (1), déparaffinées au xylol et montées directement au baume du Canada xylol.

Dans ces conditions, la réduction de l'acide osmique s'effectue uniformément et en profondeur dans toutes les cellules.

Il est aisé de reconnaître la réduction primaire en pratiquant des coupes à congélation au sortir du liquide chromo-osmique et en les montant au sirop d'APATHY ; la réduction secondaire se lit, par comparaison, sur les coupes pratiquées sur les pièces incluses à la paraffine.

B) Contrôle de la réaction du mélange chromo-osmique.

Afin de contrôler les résultats fournis par la technique au mélange chromo-osmique après fixation au BOUIN-HOLLANDE selon les indications qui viennent d'être formulées, nous avons effectué, parallèlement, dans plusieurs séries d'essais, sur des coupes faites à congélation, des colorations au Soudan III, au bleu B Z L, et des imprégnations par le mélange chromo-osmique seul, après fixation au formol-salé.

Voici comment nous opérons :

I^o COLORATION AU SOUDAN III

Les pièces étaient fixées 24 heures dans une solution de formol à 15 p. 100 en liquide physiologique à 7 gr. 50 de Cl Na p. 1000 ; lavées 24 heures dans l'eau formolée à 3 p. 100 et coupées à congélation (coupes de 5-10 μ).

(1) Formule :

Solution A : Carragahen 5 à 10 gr.
Eau distillée 500 cc.

Solution B : Blanc d'œufs battus en neige et retombés..... 5 cc.
Eau distillée 500 cc.

Mélanger parties égales de A et de B.

Conserver avec 1 % de thymol. Employer la colle diluée au 1/10^e dans l'eau distillée.

Les coupes ainsi obtenues étaient ensuite mises dans une solution alcool-acétonique de Soudan III renfermant :

Alcool éthylique à 80°	95 cm ³
Acétone	5 cm ³
Soudan III qs	à saturation.

Il importe d'effectuer la coloration en tubes parfaitement bouchés afin d'éviter l'évaporation.

Le temps de coloration variait avec le matériel étudié (en moyenne de 30 minutes à 1 heure).

Les coupes étaient ensuite lavées quelques minutes à l'alcool 70°, 60° et 40°, et montées au sirop d'APATHY dilué de moitié.

Il se produit dans quelques cas, une cristallisation du colorant sur les coupes, ce qui nuit fortement à la lecture des résultats. Aussi avons-nous utilisé parfois une solution de Soudan III à saturation dans l'alcool à 60° ou 50° faite à froid, ou à chaud au bain marie.

2° COLORATION AU BLEU B Z L.

Ce nouveau colorant des lipides a été indiqué par LISON (1933). Au cours de nos premiers essais, nous avons suivi la technique donnée par l'auteur.

On évapore en chauffant légèrement sur une lame porte objet, une goutte de la solution saturée de bleu B Z L dans l'alcool à 80° ; on dépose à la surface du colorant évaporé une goutte de liquide physiologique dans laquelle on met la coupe obtenue par congélation ; on recouvre d'une lamelle et on examine au microscope.

Ce procédé s'est montré, entre nos mains, assez imparfait et ne nous a permis d'obtenir qu'une coloration très faible et très lente de quelques inclusions et seulement sur quelques coupes.

Après divers essais, nous avons utilisé une solution de bleu B Z L faite à saturation et à froid dans l'alcool éthylique à 40° formolé à 1 p. 100 ; la présence de formol nous a paru faciliter la dissolution du bleu. Le faible degré de la solution alcoolique ainsi obtenue, nous a permis d'éviter la dissolution partielle des lipides qui s'effectue dans l'alcool à 80°.

Les coupes obtenues par congélation sont mises, un temps variable (de 30 minutes à 1 heure) en flacons parfaitement bouchés, dans la solution alcoolique formolée du bleu B Z L ; elles sont ensuite lavées quelques minutes successivement dans l'alcool à 40°, puis à 30° ; elles sont finalement montées au sirop d'Apathy dilué au demi par addition d'eau distillée. Dans ces conditions, toutes les gouttelettes lipidiques se colorent en bleu.

3° IMPRÉGNATION OSMIQUE DIRECTE.

Les coupes obtenues par congélation sur du matériel fixé au formol salé, comme il a été indiqué pour la coloration au Soudan III, sont traitées par le mélange chromo-osmique environ 1 heure.

Acide osmique en sol. aq. à 2 %	2 cm ³
Acide chromique en sol. aq. à 1 %	0 cm ³ , 1

Ces coupes sont ensuite montées au sirop d'Apathy dilué, soit directement après l'imprégnation chromo-osmique, soit après montée et descente successives dans la série des alcools de concentrations croissantes (de 10 en 10 degrés) avec séjour de plusieurs heures dans l'alcool à 80°.

C) Réactions cytologiques, dites spécifiques, de certaines classes de lipides.

Bien que le but que nous poursuivions dans le présent travail ne fût point de différencier entre eux les divers lipides que nous pouvions rencontrer dans les cellules, mais seulement de conserver au mieux les inclusions même de ces lipides, nous avons néanmoins parfois, lorsque les lipides se présentaient en abondance, cherché à connaître à quelle classe de lipides appartenaient les productions osmiophiles, mises en évidence dans les cellules, par les techniques précédemment indiquées.

A cet effet, nous avons eu recours à quelques réactions données par leurs auteurs comme spécifiques de certains lipides. Rap-
pelons néanmoins que certaines d'entre elles, telle la réaction de CIACCIO, ont été très contestées par différents auteurs.

1^o MÉTHODE DE CIACCIO.

Elle permet de mettre en évidence les « lipoides ». Elle se base sur le fait que ceux-ci traités par une solution de bichromate de potassium deviennent insolubles dans les solvants ordinaires des graisses. Le mécanisme de cette insolubilisation n'est pas entièrement connu, il consiste sans doute en une oxydation et une chromisation.

Les corps gras ainsi insolubilisés sont mis en évidence, sur les coupes, par une coloration au Soudan III.

Pour pratiquer la réaction, on opère comme suit :

Fixer de petits fragments durant deux jours dans le mélange suivant :

Solution de bichromate de potasse à 5 p. 100 ..	80 cm ³
Formol du commerce à 40 p. 100	20 cm ³
Acide acétique pur	5 cm ³

Post-chromer ensuite dans une solution de bichromate de potasse à 3 p. 100 de 5 à 8 jours à la température du laboratoire.

Laver à l'eau courante 24 heures.

Déshydrater en 24 heures jusqu'à l'alcool à 95° inclus ; laisser 2 heures dans l'alcool à 100°, 1 heure dans le xylol et dans le xylol paraffiné.

L'inclusion à la paraffine (56°) doit être rapide :

1 ^{er} bain	30 minutes.
2 ^e bain	1 heure.

Les coupes sont déparaffinées dans le xylol, puis portées successivement dans les alcools à 95°, 80°, 75° et 70° et colorées de 30 minutes à 1 heure (avec le matériel que nous avons utilisé le temps de coloration a dû être porté à 24 heures) par une solution de Soudan III à saturation dans :

Alcool à 80°	95 cm ³
Acétone	5 cm ³

Les coupes sont ensuite rincées rapidement à l'alcool à 50° et lavées à l'eau.

Accessoirement sur les coupes ainsi traitées, on peut effectuer une coloration à l'hémalum. En dernier lieu on monte les coupes au sirop d'Apathy dilué au demi.

2^o MÉTHODE DE SMITH-DIETRICH.

Cette méthode est également destinée à mettre en évidence les « lipoïdes ». Son principe est voisin de celui de la réaction de CIACCIO ; cependant les résultats fournis par les deux méthodes, d'après LISON ne sont pas superposables : « Les corps CIACCIO positifs sont toujours SMITH-DIETRICH positif, mais la réciproque n'est pas vraie. »

La réaction de SMITH-DIETRICH s'appuie sur les faits suivants : mis en présence d'une solution de bichromate de potasse, les « lipoïdes » s'unissent facilement au chrome de celui-ci. Ce composé chromé est secondairement mis en évidence par l'hématoxyline acétique de KULTSCHITZKY (1) qui donne à leur niveau une laque bleue noire résistant à l'action du différenciateur de WEIGERT au ferricyanure (Borate de sodium, 2 gr. ; ferricyanure de potassium, 2 gr. 5 ; eau distillée, 100 cm³).

Un SMITH-DIETRICH négatif ne permet aucune conclusion d'après LISON ; d'autre part, comme l'indique ce même auteur, on ne peut considérer un résultat positif caractéristique des « lipoïdes » qu'à la condition d'éliminer la présence des cholestérides.

Ayant pu fréquemment mettre en évidence les cholestérides dans les tissus étudiés, par la réaction de LIEBERMANN effectuée *in toto*, nous avons rarement utilisé la technique histologique de SMITH-DIETRICH.

3^o RECHERCHE DU CHOLESTÉROL PAR LA RÉACTION DE LIEBERMANN.

Une parcelle d'organe à étudier est desséchée dans le vide, puis écrasée dans un cm³ environ de chloroforme où on la

(1) Hématoxyline à 10 p. 100 dans l'alcool à 100°, murie au minimum durant six mois	10 cm ³
Acide acétique cristallisable à 2 p. 100	90 cm ³

laisse plusieurs heures ; 5 gouttes d'anhydride acétique et une goutte d'acide sulfurique sont ajoutées à l'extrait chloroformique filtré.

Si la réaction est positive, il apparaît au bout de quelques minutes une belle coloration verte.

(Les récipients et les pipettes utilisés pour effectuer la réaction doivent être parfaitement secs.)

Lorsque nous obtenions ainsi une réaction positive, nous avons souvent cherché à localiser le cholestérol sur la coupe même de l'organe en utilisant la méthode de ROMIEU : simple application à l'histochimie du procédé de LIEBERMANN.

4^o RÉACTION DE ROMIEU.

Pour effectuer cette réaction on fixe au formol, ou au BOUIN, sans acide acétique ; on pratique les coupes à la congélation. Celles-ci sont déposées sur une lame porte-objet ; on essore soigneusement au papier buvard et on recouvre le tout d'une goutte d'acide sulfurique concentré ; on attend 2 à 3 secondes, puis on ajoute 2 à 3 gouttes d'anhydride acétique ; on chasse le mélange en additionnant encore de quelques gouttes d'anhydride acétique ; on pose immédiatement une lamelle couvre-objet et on examine au microscope.

Le cholestérol et ses esters donnent une coloration violet lilas ou rouge pourpre tournant au vert. Les préparations ne se conservent que quelques heures.

La couleur violette ou rouge du début de la réaction n'est pas absolument caractéristique ; ce qui l'est c'est son virage au vert au bout d'un temps plus ou moins court.

D'après LISON, une réaction positive indique la présence de cholestérol ou de ses esters, mais une réaction négative n'implique pas leur absence.

5^o DÉTECTION DES STÉROLS LIBRES.

WINDAUS (1909) a indiqué que les stérols libres et leurs esters donnaient avec une solution alcoolique de digitonine un complexe insoluble bien cristallisé.

Cette réaction a été utilisée en histologie pour la première fois par BRUNSWICK (1922). On pratique cette réaction comme suit :

Sur une coupe, effectuée à congélation, placée entre lame et lamelle, on fait agir une solution à 0 gr. 50 p. 100 de digitonine dans l'alcool à 85°. On voit alors apparaître des aiguilles cristallines du complexe digitonine stérol, autour, ou en lieu et place, des inclusions de cholestérol.

On peut utiliser d'autres saponines que la digitonine, telles celles du gaïac, mais ces dernières ne présentent pas d'avantage sur la digitonine.

C'est une réaction très sensible et strictement spécifique du cholestérol libre.

Dans les quelques essais que nous avons effectués, nous n'avons pas obtenu de réaction positive.

D) Analyse de la réaction du mélange chromo-osmique.

Afin de pouvoir comprendre les divers processus qui accompagnent la réduction de l'acide osmique au niveau des inclusions lipiques intracellulaires, nous avons apporté un certain nombre de variantes à la technique primitivement indiquée (fixation au BOUIN-HOLLANDE, lavage à l'eau formolée, action du liquide chromo-osmique).

Pour la commodité de l'exposition et la compréhension des résultats fournis par l'expérimentation, nous avons appelé au cours de ce travail, « réaction témoin », la technique dont il vient d'être fait mention. Elle a été régulièrement effectuée, suivant les indications fournies page 30, parallèlement aux différents essais.

Tout d'abord, nous avons constaté que la suppression du lavage à l'eau formolée à 3 p. 100, effectué entre la fixation au BOUIN-HOLLANDE et l'imprégnation chromo-osmique, n'apportait aucune différence aux résultats terminaux, quant à la réduction de l'acide osmique.

Ce lavage, non indispensable, permet surtout l'élimination possible, de précipités.

Si l'on remplace ce premier lavage à l'eau formolée par un lavage à l'eau courante de 24 à 48 heures, on constate de très grandes différences qui se traduisent par une disparition notable dans le protoplasme des cellules du nombre des inclusions réduisant l'acide osmique.

Il est à mentionner en particulier que ce sont surtout les inclusions cytoplasmiques à contours irréguliers, très petites, réduisant faiblement l'acide osmique, qui disparaissent. Ces substances lipidiques sont éliminées par l'eau courante.

Il est assez difficile de se rendre compte si elles sont solubles dans l'eau ou non. Il est probable qu'elles y sont en partie solubles, mais il est également à peu près certain qu'une partie de celles-ci doit se trouver plus ou moins combinée ou adsorbée au protoplasme et doit être mise en liberté par le fixateur BOUIN cuprique trichloracétique.

Une telle interprétation est basée sur l'observation suivante.

Si, prenant deux cubes de 1 centimètre de côté, prélevés dans du tissu hépatique (lapin par exemple), on les met au contact du fixateur BOUIN-HOLLANDE durant 48 heures, et qu'ensuite l'un d'eux est mis à laver durant 48 heures dans un flacon renfermant 100 cm³ d'eau distillée formolée à 3 p. 100, l'autre dans un semblable flacon Erlenmeyer renfermant 100 cm³ d'eau ordinaire, on constate que tandis qu'il se forme à la surface de l'eau du robinet un dépôt moiré plus ou moins abondant, il ne se produit aucun dépôt de cet ordre à la surface de la même eau formolée ; le dépôt constitué paraît formé de lipides démasqués ou déplacés par le fixateur.

D'autre part, nous avons, dans un même temps, réuni la fixation au BOUIN cuprique trichloracétique et l'imprégnation chromo-osmique en utilisant comme fixateur les mélanges suivants :

1^o Bouin cuprique trichloracétique sans formol 8 cm³, additionné de 2 cm³ du mélange chromo-osmique.

2^o Bouin cuprique trichloracétique sans formol 8 cm³, et 2 cm³ de la solution aq. d'acide osmique à 2 p. 100.

La durée de fixation des pièces était de 24 heures ; elles étaient ensuite lavées 24 heures à l'eau formolée à 3 p. 100 avant la déshydratation et l'inclusion à la paraffine.

Le mélange chromo-osmique utilisé seul comme fixateur s'est montré très imparfait sur certains matériels, mais nous a fourni des résultats intéressants.

Enfin, dans des méthodes tout à fait analogues à la première indiquée, le fixateur BOUIN-HOLLANDE a été remplacé par d'autres fixateurs : en particulier le liquide de BOUIN trichloracétique, le sublimé à 15 p. 100 en liquide physiologique, le liquide de FLEMMING (fort).

Avec le premier liquide dont la formule est :

Solution sat. d'acide picrique	30 vol.
Formol à 40 p. 100	10 vol.
Acide trichloracétique	0 gr. 75

Nous fixons les pièces durant 24 heures ; nous faisons suivre cette fixation d'un lavage soit à l'eau formolée à 3 p. 100, soit à l'eau courante 24 heures.

L'imprégnation par le mélange chromo-osmique se fait ensuite pendant 24 à 48 heures ; nouveau lavage à l'eau formolée durant 24 heures.

Déshydratation toujours à partir des alcools faibles et inclusion à la paraffine.

A titre de comparaison, en employant le *fixateur de Flemming* (liquide fort) (fixation de 24 heures suivie d'un lavage de 24 h. à l'eau formolée à 3 p. 100), nous avons remarqué la difficulté de pénétration des tissus par l'acide osmique, même sur de petits fragments.

Nous indiquons dans le chapitre qui suit les résultats que nous avons obtenus en pratiquant ces diverses techniques.

CHAPITRE II

ESSAIS DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES ET MÉTHODES

Afin de nous rendre compte de la pénétration de l'acide osmique dans les tissus et de son pouvoir de fixation et de réduction au contact des lipides, nous avons effectué la réaction du mélange chromo-osmique, après fixation au liquide de BOUIN-HOLLANDE, sur différents animaux.

Nous avons choisi à ce sujet, l'intestin de l'anguille (*Anguilla vulgaris* T), l'ovaire du lapin, la chenille du papillon du choux.

Nous avons pu ainsi nous rendre compte, par la comparaison des résultats obtenus, de la valeur des techniques que nous avons utilisées.

Nous indiquerons successivement ces divers résultats.

I. — Mise en évidence des lipides dans les cellules par l'action osmio-réductrice.

Rappelons que la méthode employée est simple. Elle consiste à fixer les pièces durant 48 heures au liquide de BOUIN-HOLLANDE, à les laver 24 heures à l'eau formolée à 3 p. 100, et à faire agir sur elle le mélange chromo-osmique (voir page 30),

puis à monter dans la série des alcools toluène et à inclure à la paraffine.

Certains lipides osmio-réducteurs étant solubles dans l'eau courante et non dans l'eau formolée, il est procédé à titre de contrôle et de différenciation à un lavage à l'eau courante de 24 heures, au lieu et place du lavage à l'eau formolée qui précède le traitement de la pièce par le mélange chromo-osmique.

Pour la commodité de l'exposition, nous appellerons « réaction témoin », la fixation au BOUIN cuprique trichloracétique, suivie d'un lavage à l'eau formolée à 3 p. 100 et du traitement par le mélange chromo-osmique.

A) INTESTIN MOYEN DE *Anguilla vulgaris* TURTON.

Notre étude a porté sur l'intestin moyen (iléon) de plusieurs anguilles que nous désignons sous les lettres C, J, K, L, M, P, C², D², I², K², d'après la numérotation de nos cahiers d'expériences.

1^o Intestin moyen de l'anguille C.

a) Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures.

Les cellules des villosités de l'intestin montrent dans leur protoplasme, la présence d'une petite quantité d'inclusions noires ayant réduit l'acide osmique après passage aux alcools ; celles-ci sont formées le plus souvent de gouttelettes très fines plus ou moins adjacentes ; lorsqu'elles sont isolées elles prennent parfois l'apparence de dictyosomes.

A côté de ces éléments on peut également observer de petites vésicules à centre clair, à contours noirs, de grosseur variable : les unes sont punctiformes, d'autres égalant le volume du noyau ont une forme irrégulièrement mamelonnée (fig. 1).

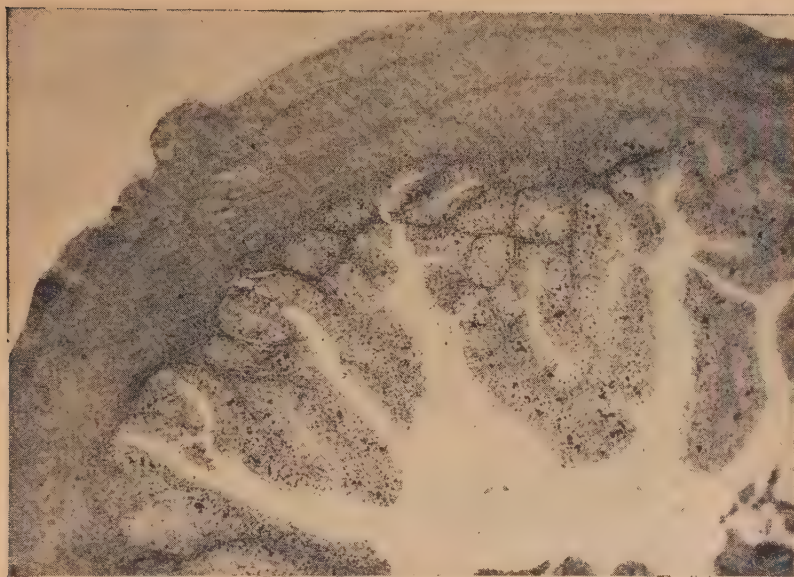


FIG. 1. — Intestin moyen de l'anguille C.
Réaction témoin chromo-osmique avec lavage à l'eau formolée 24 h.
(Gross¹ object. Zeiss n° 7, oc. Zeiss n° 1.)

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Lorsque le lavage à l'eau formolée utilisée dans la réaction témoin est remplacé par un lavage à l'eau courante durant 24 heures, on constate après action des alcools et montage de la pièce à la paraffine, que les productions osmiophiles observées précédemment sur les coupes ont disparu ; nous avons noté la formation au cours du lavage de gros cristaux insolubles dans les alcools-xylol employés par la technique.

2° Intestin moyen de l'anguille J.

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée durant 24 heures :*

Nous notons la présence de gouttelettes arrondies dans les cellules épithéliales ; il existe de nombreuses inclusions osmiophiles dans les chylières (fig. 2).



FIG. 2. — Intestin moyen de l'anguille J.
Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 h.
(Gross^t obj. Zeiss n^o 7, oc. Zeiss n^o 3.)

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

On constate dans les chylifères et le protoplasme des cellules intestinales la disparition totale des granulations osmiophiles.

3^o Intestin moyen de l'anguille K.

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

On note la présence de gouttelettes osmio réduites çà et là dans les cellules épithéliales ; elles sont grises et non noires, les inclusions des chylifères sont fortement réductrices et apparaissent en noir intense.

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

On constate la disparition totale de toutes les productions osmiophiles.

4^o Intestin moyen de l'anguille L.

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

On note : peu de cellules avec des gouttelettes noires moniliformes ; quelques inclusions arrondies brun noir dans le protoplasme des cellules. Par contre, les chylières sont remplis d'inclusions fortement colorées en noir ; elles sont par place d'une abondance telle qu'elles forment de grandes plages noires ayant réduit fortement l'acide osmique. (Il est à remarquer que ces productions sont également très abondantes dans le muscle, mais elles s'y présentent sous forme de chaînettes de fines gouttelettes.)

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Absence de productions osmiophiles ; présence de cristaux, incolores ou jaunâtres comme nous l'avons déjà observé précédemment dans des coupes lavées à l'eau courante.

5^o Intestin moyen de l'anguille M.

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Il n'existe que quelques inclusions dans le protoplasme des cellules épithéliales ; il n'y a rien dans les chylières (fin de résorption).

b) *Lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Pas d'inclusions osmiophiles.

6^o Intestin moyen de l'anguille P.

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Inclusions osmiophiles abondantes noires et de volume variable, dans l'épithélium, dans les muscles et les chylières ; elles sont surtout abondantes dans le protoplasme des cellules situées au sommet des villosités.

b) *Lavage à l'eau courante :*

Disparition complète de ces inclusions.

7° Intestin moyen de l'anguille C²

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Productions osmiophiles très abondantes, surtout dans les chylifères ; par place elles affectent une forme en tirebouchon.

Dans les coupes de l'intestin de cet animal, nous pouvons observer le passage de petites gouttelettes adjacentes, prenant en leur ensemble un aspect moniliforme, à la formation de grosses gouttelettes ; cela sans doute par la réunion de petites gouttelettes.

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Disparition de toutes les inclusions osmiophiles observées dans les coupes précédentes.

8° Intestin moyen de l'anguille D²

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Les inclusions réduisant le mélange chromo-osmique se présentent ici en amas anguleux sous forme de très fins granules dans le muscle. Il n'en existe pour ainsi dire pas dans les cellules de l'intestin. On remarque que les gouttes de graisse des cellules adipeuses péri-intestinales ont réduit fortement l'osmium ; elles apparaissent comme de grosses inclusions entièrement et fortement noires, à contours circulaires, intra-protoplasmiques.

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Toutes les inclusions osmiophiles ont disparu ; seules sont conservées les gouttes de graisses dans le tissu adipeux entourant l'intestin ; elles sont demeurées colorées en noir intense.

9° Intestin moyen de l'anguille I².

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Les inclusions réduisant l'osmium sont surtout abondantes ici dans les chylifères, où elles sont par place volumineuses.

Nous notons en outre la présence de vésicules osmiophiles déjà observées dans les précédentes fixations.

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Disparition de toutes les inclusions osmiophiles.

10° *Intestin moyen de l'anguille K².*

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Présence dans les cellules intestinales de nombreuses gouttelettes brunes ayant réduit le mélange chromo-osmique ; elles sont de taille très variable, allant de celle du fin granule jusqu'à celle de grosses gouttelettes ; leur réunion forme par place de gros amas osmiophiles ; les gouttelettes osmio-réductrices sont surtout abondantes dans les cellules situées à l'extrémité interne des villosités intestinales dirigée du côté de la lumière du tube (Fig. 3 et 4) :



FIG. 3. — Intestin moyen de l'anguille K².
Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures.
(Gross^t obj. Zeiss n° 7, oc. Zeiss n° 1.)

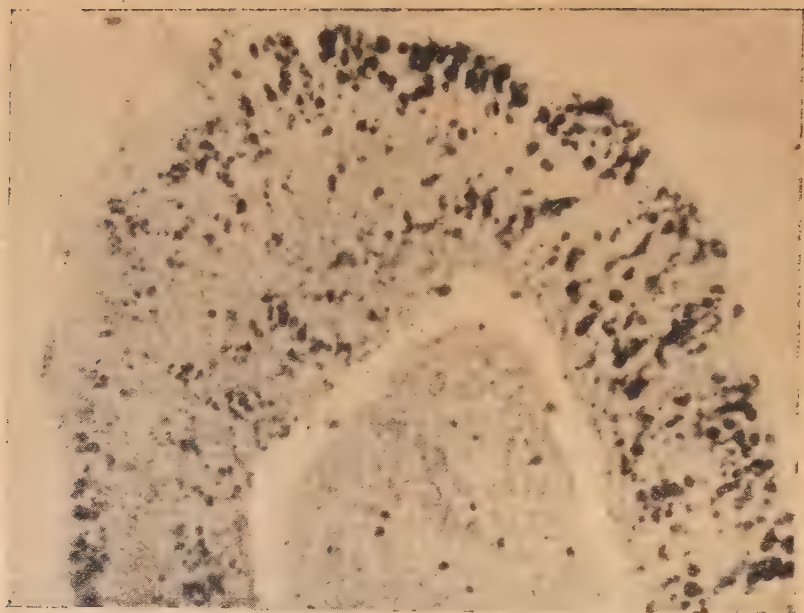


FIG. 4. — Intestin moyen de l'anguille K².
Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures.
(Grosst obj. Zeiss n° 7, oc. Zeiss n° 3.)

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Après le lavage à l'eau courante de 24 heures, la disparition de toutes les inclusions osmiophiles est totale.

De ces observations, nous pouvons conclure qu'en utilisant la technique de notre « réaction témoin », on peut mettre en évidence dans le protoplasme des cellules de l'intestin moyen de plusieurs anguilles, de nombreuses inclusions osmio-réductrices.

Celles-ci se présentent tantôt sous la forme de gouttelettes arrondies, tantôt elles prennent l'aspect de fins corpuscules sphériques, ou à contours plus ou moins anguleux; quelquefois ces productions sont étirées et forment des chaînettes. Elles

sont localisées sur certaines coupes à la fois dans les cellules épithéliales et dans les chylifères, sur d'autres coupes on ne les observe que dans les chylifères.

Elles se révèlent ainsi comme des substances lipides absorbées par les cellules intestinales qui après leur traversée cellulaire, s'accumulent dans les chylifères d'où bientôt elles disparaissent, entraînées dans la circulation.

Si au lavage à l'eau formolée à 3 p. 100 (24 heures) effectué avant l'imprégnation chromo-osmique, nous substituons un lavage à l'eau courante de 24 heures, nous constatons la disparition des inclusions osmiophiles des cellules intestinales et des chylifères observées dans la *réaction témoin*.

Les gouttes de graisse du tissu adipeux péri-intestinal persistent ; elles se comportent ainsi différemment des inclusions précédentes qui sont hydrosolubles ou déplacées par l'eau courante.

B) FOIE DE L'ANGUILLE.

Deux anguilles, I^2 et K^2 , ont été examinées.

1° Foie de l'anguille I^2 .

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Les cellules hépatiques dont le protoplasme est granuleux montrent des inclusions ayant réduit l'osmium ; celles-ci se présentent sous la forme de petites boules arrondies ou bien prennent l'aspect de très fins corpuscules constituant par place de petits amas.

Ces inclusions lipidiques ne paraissent pas être réparties au hasard dans toute l'aire protoplasmique de la cellule ; elles se disposent généralement en bandes rectilignes ou en petits amas à la périphérie de la cellule.

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

La majorité des inclusions osmiophiles observées sont conservées.

2° Foie de l'anguille K².

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Les inclusions osmio-réductrices se présentent comme sur la coupe du foie de l'anguille I² : gouttelettes arrondies réparties non sur toute la surface de la cellule, mais groupées en bandes rectilignes ou en petits amas à un pôle de la cellule.

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Comme précédemment, la plus grande partie des inclusions cellulaires osmiophiles est conservée.

C) OVAIRE DU LAPIN.

1° Lapin I.

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Peu de lipides dans les cellules interstitielles, quelques-uns dans les cellules folliculaires autour de l'ovocyte jeune.

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Il n'a pas été effectué.

2° Ovaire du lapin II.

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Sur ces coupes les cellules du corps jaune sont bourrées d'inclusions nettement arrondies et individualisées, beaucoup plus abondantes que dans les préparations précédentes, elles remplissent toute la cellule (fig. 5).

Les cellules interstitielles sont également très chargées en lipides.

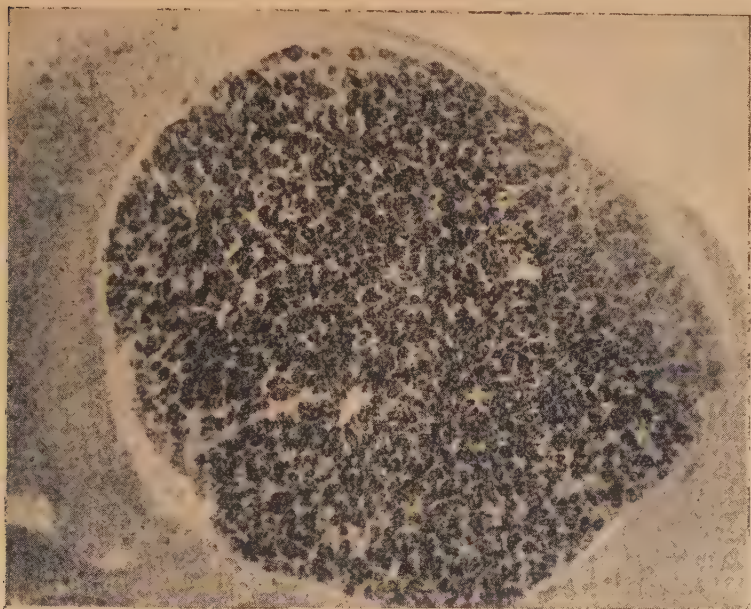


FIG. 5. — Ovaire du lapin II.
Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures.
(Grosst obj. Zeiss n° 3, oc. Zeiss n° 3.)

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

La majeure partie des inclusions est conservée, mais nous observons ici la décoloration presque totale des inclusions lipidiques dans les cellules interstitielles, alors que celles des cellules du corps jaune ont conservé leur teinte noire.

D) CHENILLES DE *Pieris brassicae* L.

Les chenilles du papillon du chou se nourrissant des feuilles du chou dont les cellules sont riches en gouttelettes d'huile, nous ont permis d'effectuer des observations intéressantes. Nous les rapportons ici. *Trois chenilles A, B, C, ont été étudiées.*

1° Chenille A.

(Fixation *in toto* ; le corps de la chenille étant coupé transversalement afin d'obtenir des tronçons de 4 mm. environ, est maintenu immergé par du coton, dans les divers réactifs.)

a) Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :

Inclusions osmiophiles abondantes dans les téguments (cellules hypodermiques) et les cellules intestinales. Dans les interstices des cellules musculaires, on note tantôt la présence d'inclusions lipoidiques, vésiculées à centre clair bordé de noir, tantôt celle de très fins granules à peine perceptibles.

Les grosses gouttes de graisse des cellules adipeuses se sont fortement colorées en noir ; les cellules adipeuses profondément situées, présentent les mêmes inclusions noires que les cellules situées à la périphérie de la pièce fixée (Fig. 6 et 7).

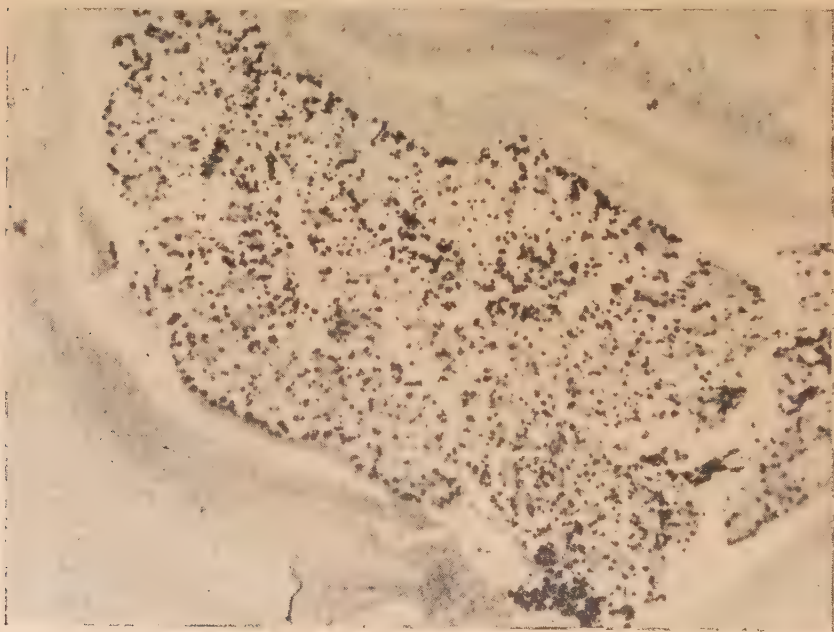


FIG. 6. — Chenille A (*Pieris brassicae* L.) : tişsu adipeux.
Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures.
(Gross! obj. Zeiss n° 7, oc. Zeiss n° 1.)

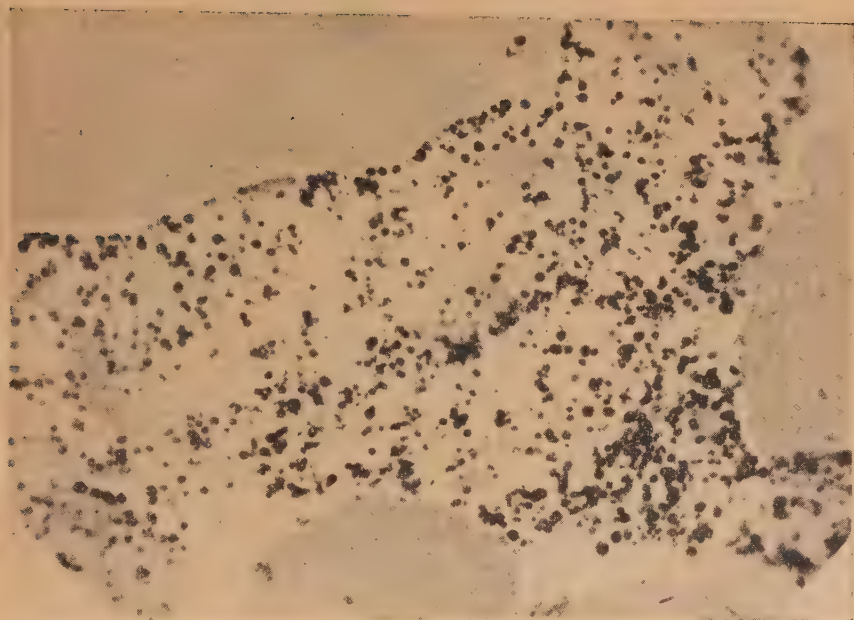


FIG. 7. — Chenille A (*Pieris brassicae* (L)) : tissu adipeux.
Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures.
(Gross^t obj. Zeiss n° 7 ; oc Zeiss n° 2.)

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Seules subsistent les gouttes de graisse du tissu adipeux ; certaines ont un centre clair avec à la périphérie un anneau noir.

2° **Chenille B.**

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Intestin : les cellules intestinales sont bourrées d'inclusions lipidiques fortement colorées par le mélange chromo-osmique ; celles-ci sont surtout abondantes vers la membrane basale (fig. 8).

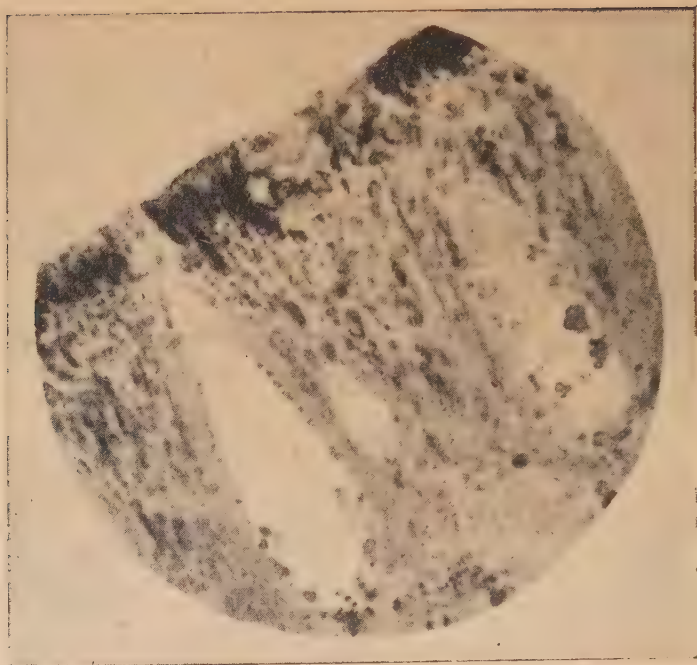


FIG. 8. — Chenille B (*Pieris brassicae* L.) : cellules intestinales.
Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures.

(Gross^t obj. à immersion Zeiss $\frac{1}{12}$; oc. Zeiss n° 3.)

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Toutes les inclusions osmiophiles ont disparu ; il s'est formé au cours du lavage de gros cristaux incolores.

3^o **Chenille C.**

a) *Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée 24 heures :*

Inclusions réduisant l'osmium abondantes dans les téguments. Dans les interstices des muscles il existe des productions osmiophiles anguleuses à centre clair, bordées de noir ; par place, se voient de très fins corpuscules noirs. Les grosses gouttes de graisse du tissu adipeux ont fortement réduit l'osmium.

b) *Lavage à l'eau courante 24 heures :*

Seules subsistent les gouttes de graisse du tissu adipeux.

D'après les diverses observations qui précèdent, se rapportant à l'intestin, au foie de l'anguille, à l'ovaire de la lapine, ainsi qu'aux diverses cellules de la chenille du papillon du chou, nous pouvons conclure que la méthode que nous avons utilisée permet d'obtenir de très bonnes fixations et une pénétration profonde dans les tissus de l'acide osmique. A la suite du traitement des tissus par la « réaction témoin » (BOUIN-HOLLANDE, lavage à l'eau formolée, liquide chromo-osmique), les lipides osmio-réducteurs se montrent sous la forme de diverses inclusions noires dans le protoplasme des cellules. Celles-ci sont bien conservées lors de l'inclusion à la paraffine.

Nous notons comme précédemment (p. 49), que certaines des inclusions mises en évidence par l'osmium, notamment les gouttelettes dans les cellules intestinales de la chenille, disparaissent par un lavage à l'eau courante, alors que d'autres, au contraire, telles les gouttelettes dans les cellules du foie de l'anguille ou de l'ovaire du lapin (corps jaune), subsistent après ce même lavage.

Il y a là une indication précieuse qui doit être attribuée, sans doute, à une différence dans la constitution chimique de ces inclusions cellulaires.

Notons que c'est en se basant sur des constatations analogues, que Mlle DEFLANDRE, dans sa thèse de doctorat ès sciences (1903), différencie les graisses neutres des savons (1).

(1) A cet effet, Mlle DEFLANDRE fixe les pièces au formol à 4 p. 100 pendant 24 heures, les divise en deux parties : la première subit immédiatement l'action de l'acide osmique (liquide de Flemming), la seconde ne subit cette action qu'après un *lavage prolongé* dans l'eau courante.

D'après l'auteur, dans la première préparation les taches d'osmium correspondent à la fois à la présence de savons et de graisses neutres ; dans les deuxièmes, elles signalent seulement la présence des graisses neutres car les savons auraient été enlevés par dissolution aqueuse.

II. — Etude de la réaction osmio-réductrice.

A. — OBSERVATIONS FAITES AVEC LE LIQUIDE FIXATEUR DE BOUIN-HOLLANDE MODIFIÉ.

Dans la précédente série d'expériences nous avons observé qu'après un lavage suffisamment prolongé à l'eau courante, diverses inclusions réduisant l'acide osmique disparaissaient, telles celles des cellules intestinales de l'anguille ; nous avons pensé voir là une indication sur la nature chimique de certaines de ces inclusions ; nous nous sommes néanmoins demandée si les différents constituants du fixateur BOUIN-HOLLANDE et en particulier le formol n'étaient pas capables à eux seuls de déterminer des artefacts osmio-réducteurs, sous la forme d'inclusions diverses (gouttelettes) demeurées dans les tissus ; n'en était-il pas de même du formol provenant de l'eau formolée à 3 p.-100 utilisée pour le lavage des pièces avant l'imprégnation chromo-osmique ?

Dans le but d'élucider cette question, nous avons effectué plusieurs essais consistant à modifier la formule du liquide fixateur de BOUIN-HOLLANDE et à supprimer tel ou tel constituant. Nos efforts ont tout d'abord porté sur l'action réductrice possible du formol.

Pour ces diverses expériences nous avons opéré sur le même matériel que précédemment, à savoir l'intestin moyen de l'anguille.

A'. — ACTION DU FORMOL.

Les essais ont été effectués, soit en recherchant l'action de l'eau formolée, voire même du fixateur cuprique après un lavage à l'eau courante sur des pièces préalablement fixées 48 heures dans le BOUIN-HOLLANDE, soit en éliminant le formol dans le BOUIN-HOLLANDE, et en supprimant tout lavage à l'eau formolée.

Nous rapportons ici nos observations.

1° *Action de l'eau formulée après un lavage à l'eau courante, étudiée toujours parallèlement à la réaction témoin.*

Essais sur l'anguille E.

a) *Réaction témoin* (fixation au BOUIN cuprique trichloracétique 24 heures, lavage à l'eau formulée 24 heures ; imprégnation 24 heures par le mélange chromo-osmique) :

On note la présence d'inclusions osmio-réductrices intra-épithéliales nettes, sous la forme de petites gouttelettes plus noires, surtout dans les cellules de l'extrémité des villosités et dans les chylifères (début d'absorption). (fig. 9.)

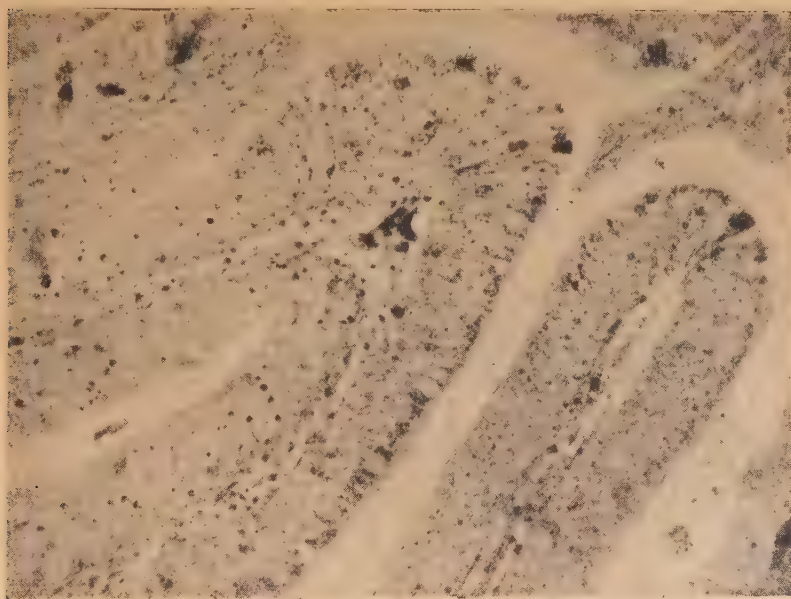


FIG. 9. — Intestin moyen de l'anguille E.
Réaction témoin avec lavage à l'eau formulée 24 heures.
(Gros obj. Zeiss n° 7, oc. Zeiss n° 1.)

b) *Fixation au BOUIN cuprique trichloracétique 24 heures ; lavage à l'eau distillée trente minutes ; mélange chromo-osmique, 24 heures :*

Comme dans la réaction témoin : inclusions non dissoutes (fig. 10).

c) *Fixation au cuprique trichloracétique 24 heures ; lavage à l'eau distillée 30 minutes, puis à l'eau formolée à 3 p. 100, 24 h. ; imprégnation chromo-osmique 24 heures :*

Inclusions moins noires-que chez le témoin.

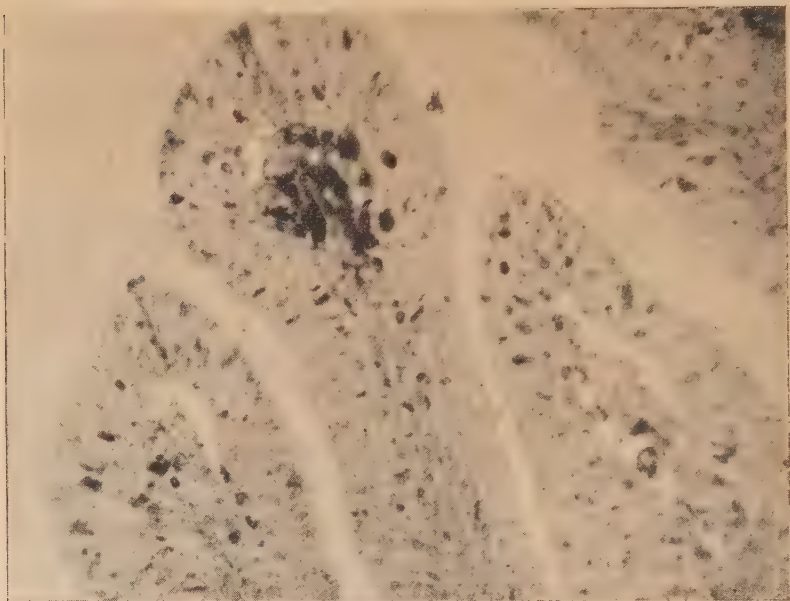


FIG. 10. — Intestin moyen de l'anguille E.
Fixation au Bouin cuprique trichloracétique 24 heures. Lavage à l'eau distillée 30 minutes, imprégnation chromo-osmique 24 heures.
(Grosst obj. Zeiss n° 7, oc. n° 1.)

d) *Fixation au cuprique trichloracétique 24 heures ; lavage à l'eau courante 24 heures, puis à l'eau formolée à 3 p. 100 24 h. ; imprégnation chromo-osmique 24 heures :*

On ne voit que de rares inclusions grises pâles et non noires ; les inclusions lipidiques observées chez le témoin ont été dissoutes au cours du lavage à l'eau courante (pas de cristaux ici).

e) *Fixation au cuprique trichloracétique 24 heures ; lavage à*

l'eau courante 48 heures, à l'eau formolée 3 p. 100 24 heures.
Imprégnation chromo-osmique 24 heures :

Présence de rares gros cristaux épars (précipitation au cours du lavage). Disparition des inclusions lipidiques.

Il résulte de ces observations que :

1° L'eau courante dissout, comme nous l'avons déjà vu, les inclusions lipidiques ;

2° L'eau formolée ne détermine pas l'apparition d'artefacts dans les cellules où rien ne noircit.

*2° Suppression du formol dans le fixateur
et l'eau de lavage des pièces.*

Nous avons également constaté la persistance des inclusions réductrices lorsque nous avons supprimé le formol dans le fixateur et l'eau de lavage ; l'essai a été effectué sur l'anguille R.

Essai sur l'intestin moyen de l'anguille R.

a) *Témoin* : Rares petites inclusions rondes et noires dans le protoplasme des cellules épithéliales avec quelques gouttelettes moniliformes ; grosses gouttelettes noires dans les chylifères (fin d'absorption intestinale).

b) *Fixation au cuprique sans formol 24 heures ; lavage à l'eau formolée 24 heures ; imprégnation chromo-osmique 24 heures :*

Résultats à peu près semblables à ceux de a.

c) *Fixation au cuprique trichloracétique sans formol 24 heures ; lavage à l'eau distillée 24 heures ; imprégnation chromo-osmique 24 heures :*

Seules persistent aux extrémités des villosités de petites inclusions noires constituées par de fines gouttelettes rondes ; il en

est de plus petites qui à peine visibles, adossées les unes aux autres déterminent de petites traînées à aspect moniliforme.

Le fixateur BOUIN-HOLLANDE *sans formol*, permet la mise en évidence des inclusions surtout visibles ici aux extrémités des villosités.

En *c*, malgré l'absence du formol et de l'eau formolée de lavage, se voient des inclusions noires ayant les mêmes localisations que chez le témoin.

Les inclusions osmio-réductrices observées ne sont donc pas dues à la présence du formol ; le formol n'a donc aucune action néfaste et ne produit pas d'artefact.

3° Action du BOUIN-HOLLANDE après un lavage à l'eau courante :

Nous nous sommes également demandée si le fixateur cuprique trichloracétique n'intervenait pas, *ipso facto*, pour produire dans les cellules les inclusions observées après l'imprégnation chromosmique.

Nous avons effectué à cet effet les contrôles suivants sur les *Anguilles G* et *I*.

Premier essai sur l'intestin moyen de l'anguille *G*.

a) Réaction témoin :

Présence de petites gouttelettes noires dans les cellules épithéliales, amas de grosses gouttes dans les chylifères (fin d'absorption intestinale).

b) Dans cette série de fixation, les pièces, après avoir été fixées 24 heures au cuprique trichloracétique formolé, ont été lavées successivement : 24 heures à l'eau courante, puis 24 heures à l'eau formolée à 3 p. 100, et finalement traitées à nouveau 24 heures par le cuprique trichloracétique formolé ; en dernier lieu, elles ont été mises 24 heures au contact du liquide chromosmique (lavage à l'eau formolée et montage dans la série des alcools).

Les inclusions réduisant l'osmium ont été entraînées par le lavage à l'eau courante et ni l'eau formolée, ni le fixateur cuprique trichloracétique formolé agissant à nouveau après ce lavage, n'ont produit d'artefacts dans les cellules sous la forme de gouttelettes noircissant dans les cellules au contact du mélange chromo-osmique. On n'observe en effet sur les coupes aucune inclusion noire.

Des résultats semblables sont obtenus avec l'anguille I.

Deuxième essai sur l'intestin moyen de l'anguille I.

a) *Réaction témoin :*

Rares petites gouttelettes, noires dans le protoplasme des cellules épithéliales ; gouttelettes noires plus ou moins volumineuses dans les chylifères (fin d'absorption intestinale).

b) *Fixation au BOUIN-HOLLANDE 24 heures ; lavage à l'eau courante 3 jours ; nouveau séjour dans le fixateur BOUIN-HOLLANDE 24 heures ; lavage à l'eau formolée 3 p. 100 24 heures ; action du mélange chromo-osmique 24 heures.*

c) *Fixation au BOUIN-HOLLANDE 24 heures ; lavage à l'eau courante 3 jours ; fixateur BOUIN-HOLLANDE 24 heures ; action du mélange chromo-osmique 24 heures.*

Les pièces traitées selon les techniques *a* et *b* n'ont montré aucune inclusion osmio-réductrice. Les inclusions réductrices observées chez le témoin ne sont donc pas le résultat d'artefacts dus au fixateur employé.

Nous avons également obtenu les mêmes résultats avec l'anguille K.

III. — Observations faites avec divers liquides fixateurs.

Nous avons comparé les résultats fournis après fixation au liquide de BOUIN-HOLLANDE et action du liquide chromo-osmique à ceux que fournissaient divers fixateurs classiques comme le BOUIN trichloracétique, le sublimé et le liquide de FLEMING (fort).

Nous avons de même essayé l'action fixatrice du liquide chromo-osmique seul, ou introduit dans divers mélanges, tels les deux suivants :

a) BOUIN-HOLLANDE trichloracétique sans formol	8 cm ³
Liquide chromo-osmique	2 cm ³
b) BOUIN-HOLLANDE trichloracétique sans formol	8 cm ³
Acide osmique à 2 p. 100	2 cm ³

Notre but était de nous rendre compte si le fixateur cuprique était apte à déterminer un mordantage spécial de divers lipides ou à les démasquer. Nos essais ont encore été effectués sur l'intestin de l'anguille (*anguilles M, K, W, I², K², L²*).

I. ESSAIS AVEC LE LIQUIDE DE BOUIN TRICHLORACÉTIQUE (I).

1^o Intestin de l'anguille M.

a) *Réaction témoin* :

Productions osmiophiles sous forme de gouttelettes arrondies dans les cellules épithéliales et dans les chylifères (p. 45).

b) *Fixation au BOUIN trichloracétique 48 heures* (suivie de la même technique que dans la réaction témoin (p. 30) :

Gouttelettes, comme précédemment clairsemées dans les cel-

(1) Formule du Bouin trichloracétique :

Solution saturée d'acide picrique.....	30 vol.
Formol à 40 p. 100	10 vol.
Acide trichloracétique	0 g. 75

lules et les chylières. Les cellules épithéliales prennent une teinte grise uniforme qui gêne l'observation des gouttelettes réductrices contenues dans leur protoplasme.

2° Intestin moyen de l'anguille K.

a) *Réaction témoin* :

Gouttelettes çà et là dans les cellules épithéliales et les chylières.

b) *Fixation au BOUIN trichloracétique* (avec technique de la réaction témoin) :

Inclusions intra-épithéliales se présentant comme dans la coupe précédente.

3° Intestin moyen de l'anguille W.

a) *Réaction témoin* :

Dans l'épithélium intestinal, présence de gouttelettes arrondies parfois en amas assez volumineux ou en chaînettes de fins granules abondantes dans les interstices du muscle ; grosses gouttes noires dans les chylières (état de résorption intestinale).

b) *Fixation au BOUIN trichloracétique* (même technique que précédemment) :

Les gouttelettes ayant réduit l'osmium se présentent comme dans la réaction témoin.

4° Intestin de l'anguille I².

a) *Réaction témoin* :

Comme nous l'indiquons page 46, les inclusions réduisant l'osmium sont surtout abondantes dans les chylières où elles se présentent par places volumineuses. Ces inclusions sont disposées en chaînettes vers la partie proximale des cellules ; il existe en outre, de grosses gouttelettes à contour noir et centre clair.

b) *Fixation au BOUIN trichloracétique* (technique précédente) :

Granulations très petites dans les cellules plus volumineuses dans les chylifères, moins nombreuses peut-être que dans la réaction témoin ; mais en somme, résultats semblables.

5° Intestin moyen de l'anguille K².

a) *Réaction témoin* (indications données p. 47).

b) *Fixation au BOUIN trichloracétique* (technique précédente) :

Nous observons ici également des inclusions réduisant le mélange chromo-osmique. Elles sont de taille très variable, par place, ce sont de très fins granules, ailleurs de gros amas volumineux.

Ces inclusions sont abondantes, surtout dans les cellules situées à l'extrémité des villosités intestinales, vers la cavité du tube digestif.

Dans la lumière intestinale existait un parasite (*helminthe*) dont les cellules du corps renfermaient également des granulations ayant réduit l'osmium.

Dans l'ensemble de la coupe, les granulations semblent moins abondantes que dans la réaction témoin.

5° Intestin de l'anguille L².

a) *Réaction témoin* :

Gouttelettes peu nombreuses, clairsemées çà et là dans les cellules épithéliales, plus abondantes dans les chylifères.

b) *Fixation au BOUIN trichloracétique* (technique précédente) :

Dans les cellules épithéliales, présence de gouttelettes noires formant des traînées ou des amas anguleux ; quelques grosses gouttes noircies dans les chylifères ; ensemble du tissu brunâtre.

De ces données, il s'en suit qu'après la fixation au liquide de BOUIN trichloracétique suivie d'un lavage à l'eau formolée et de l'imprégnation chromo-osmique, etc., les résultats obtenus sont superposables, dans l'ensemble, à ceux fournis après fixation par le BOUIN-HOLLANDE trichloracétique.

Il apparaît néanmoins que les tissus brunissent plus facilement avec le premier fixateur qu'avec le second ; de plus, un moins grand nombre d'inclusions lipiques serait décelé après emploi du BOUIN trichloracétique.

II. ESSAIS AVEC LE SUBLIMÉ A SATURATION A CHAUD DANS LE LIQUIDE PHYSIOLOGIQUE A 7 gr. 50 DE CHLORURE DE SODIUM P. 1000 (lavage à l'eau formolée iodée ou non ; imprégnation chromo-osmique comme dans la réaction témoin).

Les résultats obtenus sont en grande partie superposables à ceux du BOUIN-HOLLANDE, même après lavage à l'eau formolée iodée ou non ; ils sont cependant moins constants.

III. ESSAIS AVEC LE LIQUIDE DE FLEMMING (FORT).

Différents intestins d'anguilles (*anguilles J, K, L, M*) ainsi que les divers tissus de la chenille de l'hyponomeute du fusain *Hyponomeuta evonymella* L., ont été fixés par le liquide de FLEMMING ; les résultats obtenus ont été comparés à ceux fournis sur le même matériel, provenant des mêmes animaux, par la « réaction témoin ».

Nous indiquerons successivement les observations effectuées.

1° Intestin de l'anguille J.

a) Réaction témoin :

Présence de gouttelettes noires arrondies dans les cellules épithéliales et dans les chylifères.

b) *Fixation au Flemming* : 24 heures (lavage à l'eau formolée 24 heures, montage dans les alcools et inclusion dans la paraffine).

Très peu d'inclusions osmiophiles sont mises en évidence ; les gouttelettes sont abondantes sur une partie de la coupe ; le réactif semble avoir pénétré irrégulièrement le tissu.

2° Intestin de l'anguille K.

a) *Réaction témoin* (voir p. 44).

b) *Flemming* :

Quelques inclusions osmiophiles dans les chylifères, mais il n'en existe presque pas dans les cellules de l'épithélium intestinal.

3° Intestin de l'anguille L.

a) *Réaction témoin* :

Gouttelettes arrondies osmiophiles, parfois brunes, abondantes dans les cellules épithéliales et dans les chylifères, de grosseur très variable, volumineuses par place, ailleurs très fins granules noirs.

Ces productions sont également très abondantes dans les interstices du tissu musculaire.

b) *Flemming* :

On ne perçoit que quelques fins granules bruns.

4° Intestin de l'anguille M.

a) *Réaction témoin* (indications données p. 45).

b) *Flemming* :

Il n'existe dans les cellules que quelques fins granules noirs insignifiants.

5° Intestin de l'anguille P.

a) *Réaction témoin* :

Granulations osmiophiles abondantes et de volume variable dans l'épithélium intestinal, dans le tissu musculaire, dans les chylifères (ainsi qu'il a été indiqué p. 45).

b) *Flemming* :

On ne rencontre que de rares et fins granules osmiophiles.

6° Chenille de *Hyponomeuta evonymella* L.

(Fixation *in toto*, le corps de la chenille étant coupé transversalement en tronçons de 3 à 4 millimètres environ.)

a) *Réaction témoin* :

Intestin : Cette fixation permet de mettre en évidence dans les cellules intestinales de très nombreuses inclusions osmiophiles de taille très variable.

Nous notons la présence de très fins granules et de gros amas arrondis situés sous la brosse des cellules intestinales ; par place, on peut voir ces inclusions filtrer à travers la brosse.

Ailleurs, en leur trajet dans le protoplasme de la cellule, leur nombre est tel qu'elles compriment parfois les membranes latérales des cellules.

Dans le corps même de l'hyponomeute, le tissu adipeux montre ses grosses gouttes de graisse entièrement noires.

Il existe encore, par place, dans le muscle, des formations vésiculeuses à centre clair et à contour noir.

b) *Flemming* :

Dans les cellules intestinales, les inclusions osmiophiles sont bien moins abondantes que dans la réaction témoin (il s'agissait du même insecte).

Dans le tissu adipeux, la plupart des gouttelettes graisseuses n'ont que faiblement réduit l'acide osmique, elles montrent en général un centre clair, entouré d'un halo brun.

Il apparaît nettement que ces résultats sont dus à la non pénétration du fixateur.

IV. ESSAIS AVEC LE LIQUIDE CHROMO-OSMIQUE SEUL.

Nous avons essayé, sur les *anguilles* L, M, T, de fixer l'intestin directement par le mélange chromo-osmique (24 heures).

Utilisé ainsi sans fixation préalable des pièces au BOUIN cuprique trichloracétique ou au BOUIN, le mélange chromo-

la détection des lipides osmiophiles (réactions primaire et secondaire) à l'intérieur des tissus, la « réaction témoin » (action du BOUIN-HOLLANDE, lavage intermédiaire à l'eau formolée et action du liquide chromo-osmique ainsi qu'il a été indiqué p. 30) s'est montrée de beaucoup supérieure à toutes les autres méthodes utilisant l'acide osmique, et employées à cet effet.

Ces résultats tiennent à la grande pénétration de l'osmium au travers des tissus et à l'absence de toute vitrification du protoplasme des cellules.

IV. — Résultats comparatifs fournis par la méthode de Ciaccio et la fixation au Bouin cuprique + mélange chromo-osmique (réaction témoin).

(Voir détails de la technique de CIACCIO p. 34.)

Il nous a semblé intéressant de comparer les résultats fournis par la méthode de A.-Ch. HOLLANDE pour la détection des lipides (fixation au BOUIN cuprique, eau formolée, liquide chromo-osmique, voir p. 30) avec ceux fournis par la technique de CIACCIO. Celle-ci a été effectuée suivant le *modus operandi* indiqué page 34. Bien que peu nombreux, nos essais nous ont apporté des données intéressantes ; ils ont porté sur l'intestin des *anguilles J, L, M, P, R*, et sur la chenille de l'*Hyponomeute* du fusain.

Tout d'abord nous devons dire que les inclusions des cellules intestinales de l'anguille n'ont pas retenu le Soudan III, alors que notre réaction témoin mettait nettement celles-ci en évidence.

Chez la chenille de l'*hyponomeute*, on observe que les inclusions lipiques dans les cellules intestinales sont bien conservées ; elles paraissent toutefois moins nettement individualisées que dans la réaction témoin.

Quant au tissu adipeux de la chenille, il se présente sous la forme d'un réseau à larges mailles, vide de tout contenu, dont

les parois externes ont seules retenu le Soudan. Par place, cependant, subsistent dans certaines de ces mailles quelques inclusions arrondies fortement teintées en orange.

Peut-être ces résultats insuffisants sont-ils dus à une non pénétration des tissus par le bichromate de potasse ou plutôt à un temps insuffisant de contact de ce produit avec les lipides. Nous n'avons pas cherché à élucider ces points.

V. — Contrôle de la réaction témoin au moyen de quelques colorants spécifiques des lipides : Soudan III, Bleu de Nil, Bleu B Z L.

Nous avons cherché à contrôler les résultats fournis par le fixateur BOUIN-HOLLANDE suivi de l'action du liquide chromosmique, en nous servant de divers colorants d'aniline, plus ou moins spécifiques des lipides, tels le Soudan III, le bleu de Nil et le bleu B.Z L., ce dernier récemment introduit (1933) en cytologie par LISON.

Nos essais ont porté sur des coupes faites à congélation fixées ou non par le formol salé.

L'intestin de l'anguille et divers insectes ont constitué l'objet de nos recherches. Nous indiquerons successivement nos résultats et notre mode opératoire.

1^o COLORATION POST-VITALE SUR L'INTESTIN DE L'*anguille* J AVEC LE SOUDAN III ET LE BLEU B Z L.

Le tissu frais non fixé a été coupé directement au microtome à congélation. Le procédé de coloration utilisé a été celui indiqué par LISON pour l'emploi du bleu B Z L.

Une goutte de solution saturée dans l'alcool à 80° d'un de ces colorants suivants : bleu B Z L, bleu de Nil, Soudan III, est évaporée sur une lame chauffée à 45°.

Une goutte de sérum physiologique à 7 gr. 50 p. 1000 de

chlorure de sodium, est déposée à la surface du colorant précipité; la coupe obtenue par congélation est placée dans cette goutte de sérum physiologique. On recouvre d'une lamelle et on examine au microscope à des temps différents.

Quelques gouttelettes légèrement teintées en bleu par le bleu B Z L, sont ainsi mises en évidence dans les cellules épithéliales de l'intestin. Il est peu aisé de les localiser, les coupes du tissu frais étant très difficiles à effectuer sont toujours trop épaisses.

De plus, les cellules ne présentent aucune consistance et elles chevauchent facilement, les unes sur les autres, au moindre déplacement de la lamelle couvre-objet; toute lecture devient dès lors impossible.

Sur les coupes du tissu frais de l'intestin de l'anguille, le Soudan III, bien que colorant électivement les graisses sur le matériel fixé, n'a teinté le plus souvent que d'une manière diffuse le cytoplasme non fixé.

De semblables constatations ont été faites par J. ZWEIBAUN sur les cellules des protozoaires.

En présence de ces résultats, nous avons essayé la dilacération des tissus dans la goutte du liquide physiologique préalablement déposée sur le colorant desséché comme il a été dit précédemment. Qu'il s'agisse du Soudan III, du bleu de Nil ou du bleu B Z L, l'élection du colorant ne nous a pas paru sensiblement meilleure. Avec le bleu B Z L, pourtant, de fins globules colorés apparaissent après un temps plus ou moins variable (30 minutes environ).

2° COLORATION PAR LE BLEU B Z L, SUR LES COUPES DE TISSUS FIXÉS AU FORMOL SALÉ, OBTENUES AU MICROTOME A CONGÉLATION.

La coloration sur les tissus frais ne nous donnant pas de résultats suffisamment lisibles, nous avons opéré sur du matériel fixé préalablement 24 heures dans le formol à 15 p. 100 en liquide physiologique (à 7 gr. 50 p. 1000 de Cl Na).

Nous avons ainsi opéré sur *l'intestin des anguilles K, L, M* et la *chenille de l'hyponomeute du fusain*.

Le mode de coloration précédent a été remplacé par le suivant :

Les coupes faites au microtome à congélation étaient mises de 30 minutes à 2 heures dans une solution saturée de bleu B Z L dans l'alcool à 40° formolé à 1 p. 100 (le formol semble faciliter la coloration).

Après deux heures d'immersion dans le bain de colorant, les coupes étaient montées dans une goutte de la solution et examinées sous lamelle au microscope.

Dans de telles conditions, nous observons dans les cellules épithéliales et dans les vaisseaux chylifères de l'intestin de l'anguille, des gouttelettes de lipides fortement teintées en bleu ; celles-ci sont de grandeur et de volume différents et présentent l'aspect révélé par la réduction osmique.

Dans l'épithélium intestinal, les inclusions colorées sont par place très nombreuses ; elles sont surtout nettes vers la basale.

Il est à noter que le protoplasme proximal, c'est-à-dire dirigé vers la lumière intestinale, est légèrement teinté uniformément en bleu pâle.

Des coccidies, *Eimeria anguillæ* L. LÉGER et A.-Ch. HOLLANDE (1), protozoaires parasites, rencontrés inclus dans le protoplasme des cellules, renferment également des lipides qui sous a forme de fines gouttelettes prennent fortement le bleu. (Ces mêmes gouttelettes réduisent l'osmium dans la « réaction témoin »).

Chez les chenilles de l'*hyponomeute*, le tissu adipeux montre les globules graisseux intensément colorés en bleu. Dans la glande à soie, on voit également, teintées en bleu intense, des inclusions intra-protoplasmiques très petites et très espacées dirigées principalement vers la lumière du tube glandulaire ; le protoplasme de ces cellules est légèrement bleuté.

Les éléments colorés par le bleu B Z L, sont ici nettement superposables à ceux révélés par l'osmium dans la « réaction témoin ».

(1) L. LÉGER et A.-Ch. HOLLANDE : Coccidie de l'intestin de l'anguille. (C. R. Ac. des Sc., t. 175.)

3° COMPARAISON ENTRE LES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES COLORATIONS AU SOUDAN III, AU BLEU B Z L, ET L'ACTION RÉDUCTRICE DU LIQUIDE CHROMO-OSMIQUE.

Pour ces essais nous avons utilisé une solution de Soudan III faite à saturation dans le mélange suivant :

Alcool à 80°	95 cm ³
Acétone	5 cm ³

La solution du bleu B Z L, employée était comme précédemment : la solution de bleu B Z L à saturation dans l'alcool à 40° formolé à 1 p. 100.

Le mélange chromo-osmique était constitué par notre solution :

Acide osmique à 2 p. 100	2 cm ³
Acide chromique à 1 p. 100	0 cm ³ 1

Parallèlement aux colorations au Soudan III, au bleu B Z L, et à l'action réductrice du mélange chromo-osmique, il a toujours été effectué la réaction témoin (fixation au BOUIN-HOLLANDE, lavage à l'eau formolée, action du liquide chromo-osmique, etc., voir p. 30). La pièce du tissu frais était à cet effet divisée en trois parties.

Nos essais ont porté sur *l'intestin des anguilles S, T et U*.

Les coupes faites au microtome à congélation, après fixation au formol salé, étaient colorées au Soudan III et au bleu B Z L.

Pour la coloration au Soudan III et au bleu B Z L, elles séjournaient de 30 minutes à une heure dans les solutions de Soudan III ou de bleu B Z L, conservées en flacons bien bouchés ; elles étaient ensuite lavées rapidement et successivement dans les alcools à 70°, 60°, 50°, 40° et 30° pour le Soudan, l'alcool à 30° seulement pour le bleu B Z L. Finalement, les coupes étaient montées, pour l'examen microscopique, dans une goutte de sirop d'Apathy dilué au demi.

Voici nos résultats :

1° Intestin de l'anguille S.

a) *Coloration au Soudan III :*

La coloration au Soudan III met en évidence de nombreuses gouttelettes lipidiques dans les cellules de l'épithélium ; dans les infundibulum des glandes intestinales, les gouttelettes colorées sont surtout abondantes vers la partie basale.

b) *Coloration au bleu B Z L :*

Sur les coupes colorées au bleu B Z L, les inclusions sont bleues intenses et très nettes ; elles présentent le même ordonnancement que les gouttelettes soudanophiles.

c) *Réduction osmique :*

Quelques coupes faites à congélation ont été immergées, en flacons bouchés à l'émeri, dans le mélange chromo-osmique durant 1 heure 30. Des coupes ainsi traitées il a été fait deux lots :

1^{er} lot : Les coupes du 1^{er} lot ont été montées au sirop d'Apathy directement après traitement par la solution osmique.

A l'examen microscopique, nous avons noté la présence de gouttelettes très réfringentes teintées en *jaune brun* ; elles sont tout à fait comparables, quant à leur disposition, à leur volume et à leur forme, aux gouttelettes mises en évidence par le Soudan III et le bleu B Z L.

2^e lot : Les coupes du 2^e lot ont été traitées successivement, dans des bains d'alcools de concentrations croissantes de 10° en 10°, 24 heures depuis l'alcool à 40° jusqu'à l'alcool à 95°, 24 heures dans ce dernier, puis de même dans les alcools de concentrations décroissantes jusqu'à l'alcool à 30°.

Les coupes étaient examinées comme précédemment, montées au sirop d'Apathy dilué au demi.

Après le traitement à l'alcool des coupes, nous avons constaté le *noircissement secondaire* des inclusions ayant retenu l'osmium ; les inclusions qui apparaissent en *jaune brun* sur les coupes du premier lot, étaient colorées, après l'action de l'alcool, en *brun noir*.

d) *Réaction témoin* (inclusion à la paraffine).

Nous observons des chaînettes de gouttelettes arrondies, abondantes surtout dans les cellules des infundibulum ; le nombre, le volume des inclusions ayant réduit l'osmium, leur répartition dans les cellules et les chylifères sont absolument comparables et superposables à celles mises en évidence par le Soudan III, le bleu B Z L, ou le mélange chromo-osmique (sur les coupes à congélation).

L'identification apparaît ici complète.

2° *Intestin de l'anguille T.*

Les cellules de l'intestin de cette anguille ne présentaient que de rares inclusions lipiques. Les résultats des colorations obtenues par le Soudan III, le bleu B Z L, le mélange chromo-osmique, restent non seulement comparables entre eux, mais encore s'identifient avec ceux fournis par la réaction témoin (BOUIN-HOLLANDE, eau formolée, mélange chromo-osmique).

a) *Coloration au Soudan III :*

On note quelques inclusions lipiques colorées en orange dans les cellules épithéliales ; celles-ci sont plus abondantes dans les chylifères.

b) *Coloration au bleu B Z L :*

Les coupes traitées au bleu B Z L, montrent les mêmes inclusions colorées intensément en bleu.

c) *Réduction osmique :*

Comparativement, quelques coupes ont été traitées par le mélange chromo-osmique, de 1 heure 30 à 2 heures. Ces coupes ont été divisées en deux groupes, comme pour l'anguille S.

1^{er} *groupe* : Les coupes ont été examinées, après montage au sirop d'Apathy, directement après traitement par le mélange chromo-osmique (sans passage dans les alcools).

Les inclusions se sont montrées colorées en jaune brun ;

même disposition que sur les coupes colorées au Soudan III ou au bleu B Z I.

2^e groupe : Nous avons examiné les coupes de ce groupe après traitement par les alcools de concentrations croissantes et décroissantes ; les gouttelettes jaune brun observées dans les coupes précédentes, apparaissent ici colorées en brun noir (coloration secondaire).

d) *Réaction témoin* :

Inclusions surtout dans les chylifères. Quelques amas dans les cellules épithéliales. En somme, résultats superposables dans les quatre cas.

3^o Intestin de l'anguille U.

a) *Coloration au Soudan III* :

Ici les coupes, après un séjour de 2 heures dans la solution de Soudan, ne présentaient que de rares inclusions dans les chylifères.

Nous les avons alors laissées quatre jours dans le bain du colorant renfermé en flacon bien bouché. Dans ces conditions nous avons observé, là où précédemment nous n'avions vu que quelques inclusions, d'abondantes gouttelettes soudanophiles.

Toutefois, par suite du séjour prolongé des coupes dans le bain de colorant, celui-ci a cristallisé sur la coupe ; les cristaux obtenus étant volumineux ne gênaient pas la lecture. Certaines coupes, étant demeurées six jours dans le bain de colorant, montraient de très nombreuses gouttelettes colorées en orange ou en rouge ; on les rencontrait dans les cellules épithéliales et dans les vaisseaux chylifères.

Le bleu B Z I, a donné des résultats similaires.

b) *Réaction témoin* :

On observe dans les interstices du muscle de très nombreuses granulations noires. Dans les chylifères, il existe de grosses gouttes, et par place des amas volumineux intensément colorés en noir.

Dans les cellules de l'épithélium, il n'existe que quelques inclusions osmiophiles et de petites traînées formées de fines gouttelettes souvent accolées et teintées en noir.

En somme, là encore, les résultats obtenus avec les colorants Soudan III et bleu B Z L, sont superposables aux réductions osmiques fournies par la réaction témoin et le mélange chromo-osmique.

4^o MODIFICATIONS APPORTÉES A LA COLORATION PAR LE SOUDAN III EN VUE D'ÉVITER LA CRISTALLISATION DU COLORANT SUR LES COUPES.

Dans les coupes colorées au Soudan comme dans celles du reste, colorées au bleu B Z L, nous avons observé parfois, ainsi qu'il vient d'être dit, une cristallisation du colorant plus ou moins abondante et plus ou moins rapide.

Dans le but de remédier à cet inconvénient, nous avons essayé diverses solutions de Soudan III à saturation dans des solutions hydro-alcooliques de faible concentration telles les suivantes :

1^o Solution de Soudan III à saturation dans l'alcool éthylique à 60°, 95 cm³ + acétone 5 cm³.

2^o Solution de Soudan III à saturation dans l'alcool à 50°, 95 cm³ + acétone 5 cm³.

3^o Solution de Soudan III à saturation dans l'alcool à 40°, 95 cm³ + acétone 5 cm³.

Ces solutions ont été saturées à l'ébullition. Elles ont été essayées sur l'intestin des diverses *anguilles* A¹, C², D², F².

C'est la solution de Soudan III à saturation dans l'alcool à 50° qui nous a donné les meilleurs résultats.

Intestin de l'anguille A¹.

Nous ne prendrons comme type que les coupes de l'*anguille* A¹.

Les coupes des intestins des autres *anguilles* (C^2 , D^2 , F^2) leur étant tout à fait comparables.

a) *Coloration au Soudan III* :

Plus la coloration se fait lentement, plus elle devient élective ; le temps moyen de coloration doit varier de 17 à 23 heures ; il est à remarquer qu'après quatre mois de conservation, les coupes ne présentent pas de cristallisation apparente du colorant.

Chez l'*anguille* A^1 , les inclusions soudanophiles étaient particulièrement abondantes dans les cellules épithéliales situées à l'extrémité des villosités.

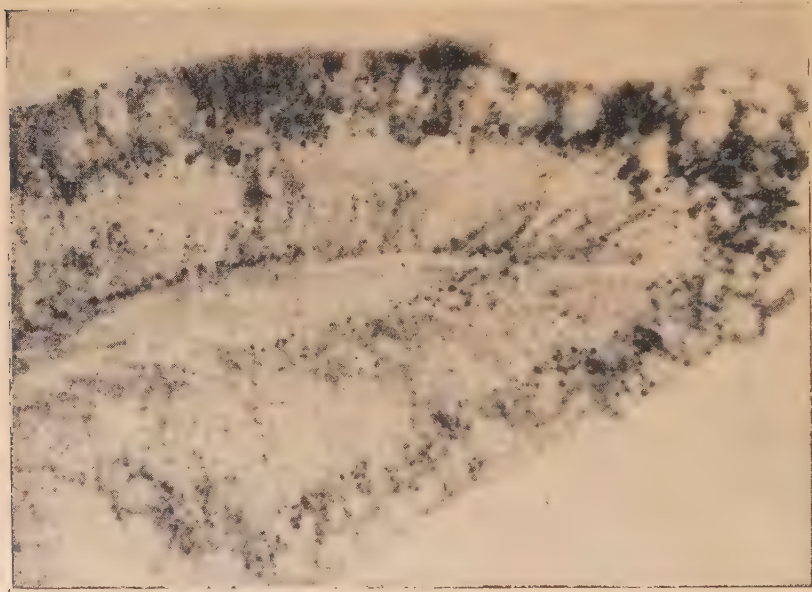


FIG. 11. — Intestin moyen de l'anguille A^1 .

Coloration au Soudan III sur les coupes effectuées à congélation.

(Gross¹ obj. Zeiss n° 7, oc. Zeiss n° 3.)

Sur les coupes à congélation, traitées par le mélange chromosmique, nous avons observé les mêmes inclusions que sur les coupes colorées au Soudan.

Les gouttelettes ainsi mises en évidence étaient jaune brun et noircissaient après passage dans les alcools.

b) *Réaction témoin* (fig. 12 et 13) :

Sur les coupes, les inclusions ayant réduit l'acide osmique

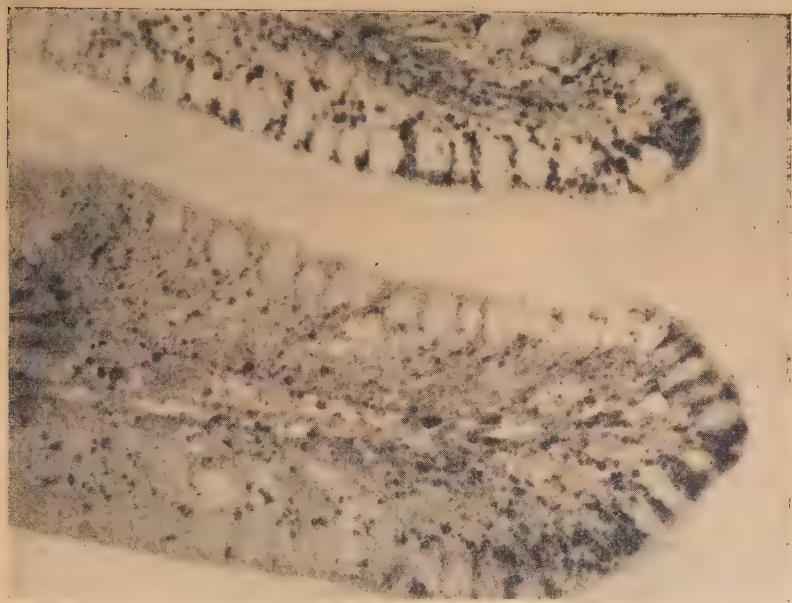


FIG. 12. — Intestin moyen de l'anguille A¹.

Après la réaction témoin avec lavage à l'eau formulée 24 h.
(inclusion à la parafine). (Gross¹ obj. Zeiss n° 7, oc. Zeiss n° 3.)

sont tout à fait comparables, quant à la forme, au nombre et à la localisation, aux inclusions décelées par le Soudan et le mélange chromo-osmique sur les coupes effectuées au microtome à congélation.

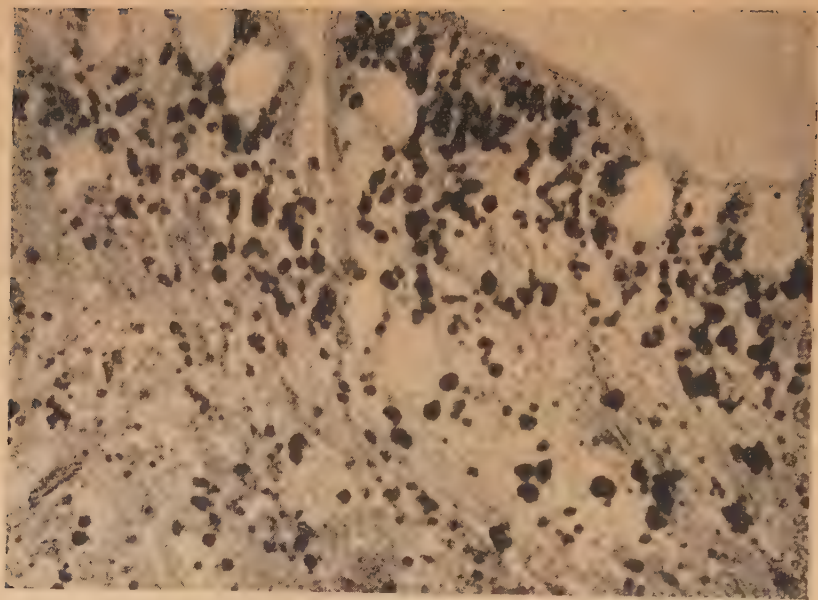


FIG. 13. — Intestin moyen de l'anguille A¹.
Réaction témoin avec lavage à l'eau formolée.
(Grosst^s obj. à immersion Zeiss 1/12, oc. Zeiss n° 3.)

Après un lavage à l'eau courante, disparition de ces inclusions (fig. 14).



FIG. 14. — Intestin moyen de l'anguille A¹.
Réaction témoin avec lavage à l'eau courante montrant la disparition
des inclusions osmiophiles. (comparer avec les fig. 11, 12 et 13.)
(Grosst^s obj. Zeiss n° 7, oc. Zeiss n° 1.)

VI. — Remarques au sujet de la différenciation histo-chimique des lipides réduisant l'acide osmique.

Nous avons vu dans l'exposé historique de ce travail que plusieurs auteurs avaient tenté d'identifier histochimiquement les constituants des lipides intracellulaires réduisant l'acide osmique.

Comme nous l'avons dit au début de notre mémoire, notre but n'était pas d'effectuer des recherches en vue d'une telle identification.

Toutefois, nous trouvant en présence d'inclusions osmiophiles présentant le phénomène de « noircissement secondaire », nous avons pensé devoir effectuer sur les gouttelettes lipidiques incluses dans les cellules de l'intestin et du foie de l'anguille, la recherche du cholestérol et des lécithines.

A simple titre d'observation, nous mentionnons nos résultats et notre manière d'opérer.

RECHERCHE DU CHOLESTÉROL.

a) Réaction de LIEBERMANN :

Nous avons effectué *in-toto*, la recherche du cholestérol par la réaction de LIEBERMANN, sur l'intestin moyen des *anguilles* I^2 , J^2 , K^2 , sur le foie de ces anguilles et sur la capsule surrénale du lapin.

A cet effet, une parcelle d'organe est desséchée dans le vide, puis écrasée dans un cm^3 environ de chloroforme où on la laisse plusieurs heures ; 5 gouttes d'anhydride acétique et une goutte d'acide sulfurique sont ajoutées successivement, à l'extrait chloroformique, filtré.

La réaction s'est montrée positive et s'est traduite par l'apparition d'une belle coloration verte au bout de quelques minutes.

b) *Localisation histochimique du cholestérol*
(Méthode de ROMIEU) :

Ayant obtenu une réaction nettement positive sur l'intestin et le foie desséchés de l'anguille et sur la capsule surrénale du lapin, nous avons essayé, par la méthode de ROMIEU, de localiser dans la cellule, sur les coupes de l'organe, le cholestérol ou ses esters ; en appliquant la méthode de ROMIEU (voir technique p. 36) nous avons eu toujours une réaction négative.

c) *Réaction à la digitonine* :

Parallèlement aux réactions précédentes sur l'intestin moyen des *anguilles* I², J², K², et sur la capsule surrénale du lapin, nous avons effectué la méthode à la digitonine de WINDAUS, pour la recherche du cholestérol libre.

A cet effet, les coupes de l'organe sont faites au microtome à congélation, et placées, entre lame et lamelle, dans une goutte de solution de digitonine à 0 gr. 50 p. 100 dans l'alcool à 85°.

A l'examen microscopique, on doit voir apparaître, dans le cas d'une réaction positive, des aiguilles cristallines du complexe digitonine-stérol, au niveau des granulations formées par ce lipide.

Contrairement à notre attente, tous nos essais se sont montrés négatifs.

Nous ne faisons qu'enregistrer ces faits.

CHAPITRE III

APPLICATION DE LA MÉTHODE CHROMO-OSMIQUE A LA RÉACTION DU CANCER DE MAX ARON SUR LA CORTICO-SURRÉNALE DU LAPIN (1)

I. — Indication des recherches de Max Aron.

Dans un article paru dans la presse médicale et dans diverses communications, MAX ARON a attiré l'attention sur la présence dans l'urine des individus atteints de cancer, d'un principe spécifique pouvant être mis en évidence par son action sur la cortico-surrénale du lapin et aider ainsi au diagnostic du cancer.

MAX ARON émet l'hypothèse suivante qui est à la base de ses recherches : « Les tumeurs malignes doivent être la source de substances issues soit de la dégénérescence de cellules cancéreuses, soit des échanges nutritifs propres à ces cellules.

De telles substances, si elles existent vraiment, doivent se retrouver dans l'urine. »

Afin de les mettre en évidence, l'auteur a choisi comme test morphologique de leur action, le cortex de la glande surrénale en raison de sa sensibilité à divers agents d'intoxication exogène ou endogène.

(1) Nous remercions Monsieur FAVRE, qui a bien voulu nous aider dans l'exécution de cette réaction.

Nos remerciements vont également à Monsieur BÉTOULIÈRES, interne au centre anticancéreux, qui a bien voulu nous fournir toutes les données médicales nécessaires à l'établissement des réactions que nous rapportons ici.

Normalement, cette glande se compose de trois zones :

- 1^o la zone glomérulaire la plus externe ;
- 2^o la zone fasciculée ;
- 3^o la zone réticulée.

La fasciculée est la plus étendue des trois et elle est caractérisée par des cellules dont le protoplasme est bourré d'enclaves lipidiques qui, solubles dans les alcools et xylol, disparaissent lorsqu'on traite la glande par les techniques histologiques.

C'est pourquoi, sur les coupes de la glande, le protoplasme des cellules apparaît finement vacuolisé, clair et spongieux, d'où le nom de « spongiocytes » donné à de tels éléments.

MAX ARON, dans une série d'expériences, injecte des extraits urinaires à des lapins et constate sur des coupes de la surrénale les modifications suivantes :

« Les vacuoles lipidiques disparaissent, les spongiocytes diminuent de volume et leur cytoplasme prend un aspect compact et vivement colorable. Tout se passe comme si les injections provoquaient soit une excrétion massive, soit une destruction des enclaves lipidiques du cortex surrénal, notamment dans la zone fasciculée. Cette réaction est souvent d'une intensité telle que la cortico-surrénale apparaît complètement privée d'enclaves graisseuses. »

Devant de tels résultats, il nous a paru intéressant de reprendre les travaux de MAX ARON afin de mettre en évidence par nos techniques chromo-osmiques la disparition des enclaves graisseuses, signalée par l'auteur.

Selon M. ARON, le principe qui déterminerait cette excrétion lipoïdique des surrénales du lapin serait strictement spécifique ; sa mise en évidence aurait donc une valeur pour le diagnostic du cancer.

De plus, le sérum des lapins traités par l'extrait urinaire des malades cancéreux présenterait une propriété nouvelle ; en effet, ce sérum injecté à des lapins neufs empêcherait, chez ces derniers, l'action du principe urinaire des cancéreux. Il ressort de là qu'un tel principe se comporterait comme un antigène spécifique, déterminant chez l'animal traité la formation d'anticorps.

Tout récemment, dans le *Bulletin de la Société de Biologie* (t. 18, 1935, p. 88), M. ARON signale, en outre, dans l'urine des cancéreux, la présence d'une « gonado-stimuline » active sur l'ovaire, déterminant dans les réactions discrètes une dilatation de la plupart des follicules qui, dans les cas extrêmes, arrive à une « hypertrophie considérable donnant un aspect polykystique à l'organe ».

La méthode d'extraction de cette « gonado-stimuline » est identique à celle qui permet d'obtenir le principe actif sur le cortex surrénal. Un même animal fournit donc deux tests sensibles pour la « réaction du cancer » : la capsule surrénale et l'ovaire.

II. — Méthode d'extraction du principe urinaire.

Il faut préparer ce principe à des taux suffisants, sans être obligé toutefois d'injecter aux animaux des quantités trop fortes ou toxiques de liquide.

C'est pourquoi l'auteur de la méthode a recours à la précipitation de l'urine par l'alcool à 95°.

Dans un grand verre à pied, on additionne un volume d'urine, fraîchement émise, de trois volumes d'alcool à 95° ; on agite, il se forme un abondant précipité qui se sédimente lentement ; on laisse déposer 12 heures ; on décante la partie limpide ; on centrifuge le reste.

On sèche légèrement le précipité obtenu, sur un papier buvard stérile ; on le reprend par du sérum physiologique stérile à 9°/100 (de 5 à 10 cm³ pour 100 cm³ d'urine précipitée).

On agite longuement la suspension ainsi obtenue et on filtre.

Le filtrat renferme le principe actif. On l'injecte sous la peau du lapin qui est sacrifié le surlendemain de la dernière injection.

Le volume total d'urine à précipiter doit être de 1600 cm³ à 2000 cm³ environ.

Par suite des variations de la teneur en lipides de la cortico-surrénale, d'un animal à l'autre, M. ARON apporte à sa technique

première la modification suivante : avant toute expérience, il prélève un fragment de la glande comme témoin.

Au cours de cette biopsie, on ne doit pas enlever plus du quart ou du tiers d'une surrénale, car cela entraînerait non une diminution des enclaves lipidiques, mais au contraire une hypertrophie compensatrice de la glande restante, susceptible, à un certain degré, d'annihiler la « réaction du cancer ».

On doit, en outre, commencer les injections d'extraits urinaire de un à deux jours après l'opération.

Pour pratiquer la biopsie, M. ARON indique « de faire une incision parallèlement à l'axe dorsal, sur une longueur de 6 à 8 cm. environ, d'avant en arrière à partir du rebord costal à deux ou trois travers de doigt de la colonne vertébrale ».

On repousse le péritoine et on atteint ainsi la surrénale gauche ou droite, dont on coupe à l'aide d'un ciseau courbe, une extrémité suivant un plan perpendiculaire à son axe longitudinal.

III. — Techniques de fixation et de coloration de la surrénale, suivant Aron.

Le fragment de surrénale excisé à la biopsie, comme la glande prélevée après l'autopsie, sont fixés, selon les indications de M. ARON, au liquide de Zenker formolé à 7 %, durant 24 heures.

Ses pièces sont incluses à la paraffine. Les coupes sont colorées au glychemalun-érythrosine.

Avant la coloration, les coupes, après avoir été déparaffinées et collodionnées, sont traitées 5 minutes par de l'alcool à 75° iodé, et plongées une minute dans une solution d'hyposulfite de soude à 1 p. 100.

Elles sont ensuite lavées à l'eau courante 5 minutes et colorées 20 minutes au glychemalun, lavées rapidement à l'eau distillée, puis à l'eau courante, colorées rapidement 30 secondes environ à l'érythrosine (1) à 1 gr. 50 p. 100, lavées à l'eau courante 2 à

(1) Ces temps de coloration nous ont été aimablement communiqués de vive voix par Monsieur et Madame Max ARON. Nous tenons à les en remercier.

3 minutes et déshydratées successivement dans les alcools 70°, 95° et absolu.

Comparativement à la méthode de ARON, nous avons effectué la fixation au BOVIN cuprique trichloracétique suivie de l'imprégnation chromo-osmique suivant la technique indiquée au chapitre I, page 30.

Parallèlement, une fixation au formol salé était pratiquée afin de procéder ultérieurement à la coloration au Soudan III et au bleu B Z L, et à l'imprégnation chromo-osmique (voir pp. 31-32).

Nous mentionnons ici deux observations se rapportant à la réaction du cancer selon M. ARON.

IV. — Observation I.

Mme C., 25 ans.

Métastase ganglionnaire. Cancer du sein opéré.

Opérée du sein droit en mai 1933. Adénopathie sous-claviculaire droite en juin 1934 (tumeur ulcérée du sein).

28 juin 1935 : Douleurs lombaires avec irradiation dans les jambes en rapport avec métastases vertébrales.

8 mars 1935 : Apparition de nombreux petits nodules métastatiques cutanés.

Radiographie : Noyaux de décalcification disséminés sur la colonne vertébrale, donnant un aspect pommelé dans ces régions ; mêmes images au niveau des côtés.

Quelques ébauches de localisation sur le crâne.

Histologie : Carcinome typique, squirrhe avec métastase ganglionnaire.

I) « RÉACTION DU CANCER » selon ARON :

Le prélèvement de l'urine de cette malade a été fait du 20 au 22 février.

Le volume total d'urine mis en expérience a été de 1930 cm³.

Le précipité obtenu, par précipitation par l'alcool à 95°, a été repris par 8 cm³ de sérum physiologique à 9 p. 1000 stérile, pour 100 cm³ d'urine précipitée.

Le 20 février a été effectuée la biopsie de 1/5^e de la capsule surrénale droite d'un lapin femelle (afin de nous permettre le contrôle de l'action du principe urinaire sur l'ovaire).

Ce fragment de glande a été fixé d'une part : au formol à 15 p. 100 en liquide physiologique à 7 gr. 50 p. 1000 de Cl Na pour les coupes à congélation et les colorations au Soudan III et bleu B Z L ; d'autre part au BOUIN cuprique trichloracétique 48 h., avec lavage à l'eau formolée, imprégnation chromo-osmique et inclusion à la paraffine.

Les 1^{re} et 2^e injections de l'extrait urinaire ont été faites le 21 février, sous la peau de l'animal ; il en a été de même des 3^e et 4^e injections faites le 22 février et des 5^e et 6^e injections faites le 23 février.

Au total, nous avons injecté 154 cm³ d'extrait urinaire.

L'animal a été tué le 25 février à 18 heures. Les surrénales ont été prélevées et fixées comme le fragment de la glande excisée à la biopsie. De plus, fixation au Zenker-formol et coloration des coupes au glychemalun érythrosine, selon la technique de ARON (p. 86).

2) INTERPRÉTATION DES COUPES :

A: — Capsule surrénale prélevée à la biopsie.

a) *Coloration au Soudan III, au bleu B Z L et action du mélange chromo-osmique sur les coupes effectuées à congélation :*

Les cellules de la cortico-surrénale se montrent bourrées d'enclaves à aspect gras, et fortement soudanophiles. Ces gouttes de lipides sont d'une abondance telle, qu'elles forment de gros amas dans le protoplasme, remplissant toute la cellule.

Nous obtenons des figures analogues avec la coloration au bleu B Z L : les enclaves lipidiques apparaissent sous forme de gros amas teintés intensément en bleu.

De même ces coupes à congélation, pour la recherche de la

réduction primaire de l'osmium, sont traitées une heure par le mélange chromo-osmique et montées en snop d'Apathy directement.

Elles montrent leurs granulations lipidiques disposées comme dans les colorations au Soudan III ou au Bleu. B Z L; ces granulations sont fortement réfringentes et colorées en jaune brun.



FIG. 15 — Capsule surrénale du lapin I prélevée à la biopsie.
Fixation au Bouin cuprique trichloracétique, et imprégnation
chromo-osmique précédée d'un lavage à l'eau formolée 24 h.
(Gross¹ : obj. zeiss n° 3, oc. zeiss n° 2.)

Nous avons pu observer le noircissement secondaire de ces productions osmiophiles, après passage dans la série des alcools de concentrations croissantes.

b) *Fixation des pièces au BOUIN cuprique trichloracétique* (48 heures) et imprégnation chromo-osmique précédée d'un lavage de 24 heures à l'eau formolée à 3 p. 100, montage dans la série des alcools et inclusion à la paraffine.

Les enclaves à aspect grasseux observées dans les préparations précédentes persistent et apparaissent fortement teintées en noir. De l'examen de ces diverses préparations, nous concluons que nous sommes en présence d'une cortico-surrénale très riche en enclaves lipidiques (Fig. 15, p. 89).

B. — Examen des coupes de la surrénale prélevée après l'autopsie du lapin ayant reçu les injections d'extrait urinaire.

a) *Fixation au formol salé, colorations : au Soudan III, au bleu B Z L, imprégnation chromo-osmique*, effectuées sur les coupes obtenues par congélation :

Nous constatons la persistance des enclaves grassieuses disposées comme précédemment en amas dans les cellules, elles sont jaune orange après traitement des coupes par le Soudan III, intensément bleu dans la coloration au bleu B Z L.

Après imprégnation chromo-osmique des coupes à congélation, ces mêmes granulations lipidiques apparaissent encore en jaune brun ; elles noircissent après passage dans les alcools de concentrations croissantes.

b) *Fixation au cuprique trichloracétique 48 heures, imprégnation chromo-osmique après lavage de 24 heures à l'eau formolée à 3 %, inclusion à la paraffine* (passage aux alcools toluène) :

Présence, encore, sur ces coupes, des mêmes productions osmiophiles observées sur les coupes de la biopsie (Fig. 15).

En résumé, nous notons, après l'examen de ces diverses préparations, la persistance des enclaves lipidiques de la cortico-surrénale, après injection d'urine cancéreuse au lapin.

c) *Fixation au Zenker-formol, coloration au glychemalun-érythrosine* selon la technique de M. ARON :

Présence de noyaux crénelés chez les spongiocytes, augmentation de la basophilie du protoplasme des cellules.

C. — Réaction sur l'ovaire.

La réaction se montre positive ; les follicules sont en effet très hypertrophiés.

Observation II.

Mme J., 39 ans.

Sarcome du maxillaire inférieur.

Janvier 1934 : Résection incomplète de la tumeur ; deux séances de R. X. en janvier 1935 (24 et 25 janvier).

8 mars 1935 : Extension de la tumeur ; bourgeon néoplasique dans la cavité buccale ; infection surajoutée.

Biopsie : Prolifération anarchique des cellules conjonctives ; les figures de caryocinèses sont nombreuses, parfois atypiques ; les vaisseaux sanguins présentent la structure des vaisseaux sarcomateux.

Très mauvais état général.

1) RÉACTION DU CANCER :

Le prélèvement de l'urine de cette malade a été fait du 25 au 29 mars 1935. Le volume d'urine par 24 heures est faible, 350 cm³ environ ; nous avons utilisé pour notre expérience 1675 cm³ qui ont été précipités par 3 volumes d'alcool à 95°. Le précipité ainsi obtenu a été repris par 8 cm³ de sérum physiologique à 9 0/00 stérile pour 100 cm³ d'urine précipitée.

Biopsie de 1/5^e de la capsule surrénale droite d'un lapin femelle, le 23 mars.

Fixation : a) Au formol à 15 p. 100 en liquide physiologique (à 7 gr. 50 p. 1000 de Cl Na) 24 heures, pour les colorations au

Soudan III et au bleu B Z L, ainsi que pour l'imprégnation par le mélange chromo-osmique.

b) Au BOUIN-HOLLANDE, 48 heures ; lavage à l'eau formolée à 3 % 24 heures. Imprégnation chromo-osmique 48 heures ; inclusion à la paraffine.

c) Fixation au Zenker-formol, coloration au glychémalum érythrosine.

Injections au lapin du 26 au 30 mars ; au total, 134 cm³.

L'autopsie a été faite le 31 mars à 19 heures. Les surrénales prélevées ont été fixées comme le fragment de la glande prélevé à la biopsie.

2) INTERPRÉTATION DES COUPES.

A. — Capsule surrénale prélevée à la biopsie.

a) *Fixation au formol salé ; coloration au Soudan III, au bleu B Z L et imprégnation chromo-osmique :*

Sur les coupes à congélation traitées par le Soudan III et le bleu B Z L, les enclaves lipidiques sont fortement colorées en orange et en bleu, mais elles sont en moins grande abondance que dans la capsule surrénale de notre première observation. Au lieu de se présenter en amas, elles forment des gouttelettes arrondies et individualisées dans les cellules, qu'elles remplissent pourtant presque en totalité.

Mêmes figures avec les coupes à congélation traitées par le mélange chromo-osmique ; les inclusions sont brun jaunâtre ; elles ne noircissent que secondairement par passage dans les alcools de concentrations croissantes depuis l'alcool à 40° c.

b) *Fixation au BOUIN-HOLLANDE, 48 heures ; imprégnation chromo-osmique 48 heures (après lavage à l'eau formolée à 3 % 24 heures ; inclusion à la paraffine) :*

Les cellules de la cortico-surrénale apparaissent remplies de gouttelettes lipidiques fortement noircies.

Cette surrénale, bien que moins riche en lipides que celle de

notre précédente observation, l'est tout de même suffisamment pour nous permettre d'apprécier ultérieurement une variation possible dans la teneur en lipoides, lors de l'établissement de la réaction du cancer, selon la technique de M. ARON.

B. — Examen des coupes de la surrénale prélevée après l'autopsie du lapin ayant reçu les injections d'extrait urinaire.

a) *Coupes à congélation après fixation au formol salé, suivies d'une coloration au Soudan III, au bleu B Z L ou d'une imprégnation par le mélange chromo-osmique :*

Dans toutes ces colorations, comme dans notre première observation, nous obtenons des figures analogues à celles obtenues avec les coupes de la capsule biopsiée. Les granulations lipidiques paraissent tout aussi abondantes.

b) *Fixation au cuprique trichloracétique 48 heures ; lavage à l'eau formolée 24 heures, imprégnation chromo-osmique 48 heures.*

Nous ne notons pas de différence avec les coupes de la biopsie obtenues par la même technique ; les inclusions lipidiques fortement noircies sont aussi nombreuses.

c) *Fixation au Zenker formol, coloration au glychemalin érythroisine :*

Présence ici encore de noyaux crénelés chez les spongiocytes, et augmentation de la basophilie du protoplasme.

C. — Réaction sur l'ovaire.

Quelques follicules apparaissent légèrement hypertrophiés. Nous n'avons pu faire que ces deux observations.

CONCLUSIONS

Que conclure au sujet des résultats constatés ?

Tout d'abord, nous devons être très prudente dans nos conclusions, étant donné le nombre très restreint de nos observations.

Sans aucunement vouloir nier la spécificité de la réaction du cancer de M. ARON et encore moins son principe, nous croyons pouvoir dire néanmoins que dans les deux cas examinés, l'extrait de l'urine cancéreuse n'a pas influencé la teneur en lipoïdes de la cortico-surrénale.

Nous pensons qu'il faut chercher dans des modifications cellulaires autres que celles de leur teneur en lipides, le contrôle de l'action du principe spécifique de l'urine de cancéreux, sur les surrénales du lapin.

L'examen des coupes fixées au Zenker formol et colorées au glychemalun-érythrosine nous incite à présumer qu'il existe bien une intoxication des cellules de la cortico-surrénale ; celle-ci se traduit par différents caractères, à savoir :

1^o Augmentation de la basophilie de leur protoplasme ;

2^o Contraction du protoplasme ;

3^o Clivage possible des substances protéo-lipoïdes rendant peut-être leur dissolution plus aisée par les solvants des corps gras employés dans les techniques histologiques habituelles.

La présence parfois de noyaux crénelés chez les spongiocytes parle également dans le sens d'une intoxication cellulaire.

Il est bien certain que la traduction des modifications cytologiques de la cortico-surrénale, hormis la présence ou l'absence des lipoïdes, est parfois malaisée au cours de la réaction de ARON ; tandis que les modifications des ovisacs de GRAAF, leur hypertrophie, en particulier, sont des plus manifestes.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons au cours de notre travail cherché à obtenir, par une méthode histologique appropriée, la conservation, après inclusion à la paraffine, des enclaves lipoprotéiques osmioréductrices des cellules.

Il importait à cet effet d'avoir une bonne fixation des tissus et une pénétration suffisante de l'osmium, dont l'action réductrice ne se manifeste habituellement que sur les premières rangées de cellules au contact du réactif.

La fixation que nous avons appelée au cours de l'exposé de notre travail « réaction témoin » a répondu à ce desiderata. Elle consiste à fixer les tissus par le liquide BOUIN-HOLLANDE durant 24 heures, à les laver à l'eau formolée 24 heures et à les imprégner pendant 24 heures au moyen d'un mélange chromo-osmique renfermant : solution aqueuse d'acide chromique à 1 p. 100, 0 cm³ 1 + solution d'acide osmique à 2 p. 100 : 2 cm³.

Grâce à une telle réaction, pratiquée en deux temps, la pénétration de l'osmium se fait profondément, cela aussi bien dans les tissus compacts comme ceux fournis par l'intestin, le foie de l'anguille, ovaire, capsule surrénale du lapin, que dans les tissus lâches de l'insecte (chenilles diverses).

Dans les tissus ainsi traités, la fixation est parfaite, les coupes sont très lisibles et il n'est pas besoin d'effectuer une coloration secondaire par les colorants d'aniline.

Toutes les productions ayant réduit l'osmium sont conservées après l'inclusion à la paraffine.

Nous observons ainsi des inclusions osmio-réductrices de forme

très variable ; dans certaines coupes (intestin de l'anguille), nous notons même la présence de corps en croissants rappelant les éléments décrits parfois par les auteurs sous le nom de dictyosomes (appareil de GOLGI).

Si, dans la réaction témoin, nous substituons au lavage à l'eau distillée formolée à 3 p. 100, un lavage à l'eau courante, nous constatons que certaines des inclusions osmioréductrices, telles celles observées dans les cellules intestinales de l'anguille, ne sont plus mises en évidence, alors que d'autres, telles les gouttes lipiques rencontrées dans les cellules du foie (anguille ou de l'ovaire (lapin), subsistent.

Nous pensons voir en cela une indication possible se référant à la nature chimique différente des inclusions observées.

Nous nous sommes demandée si le formol intervenait dans la formation de ces productions osmiophiles décelées.

La persistance des inclusions osmioréductrices après suppression du formol dans le fixateur et l'absence de tout lavage des pièces à l'eau formolée, montre que le formol ne peut être mis en cause.

Les réactions dites spécifiques des lipides, telles la réaction au Soudan III, au bleu B Z L, effectuées sur les coupes obtenues à congélation, nous ont permis un contrôle de notre réaction témoin ; elles nous ont donné des résultats entièrement superposables à ceux fournis par l'osmium dans nos conditions d'expérience.

L'imprégnation chromo-osmique effectuée directement sur les coupes à congélation nous a permis de mettre en évidence la réduction primaire et la réduction secondaire de l'acide osmique ; cette dernière ne s'effectue qu'après passage dans les alcools, en particulier dans les alcools de faible degré alcoolique.

La fixation par le mélange chromo-osmique après action du BOUIN-HOLLANDE s'est révélée supérieure à la fixation par le mélange fort de FLEMMING ; ce réactif s'est montré entre nos mains, un fixateur peu pénétrant.

Nous avons appliqué notre méthode de mise en évidence des lipides intracellulaires à la réaction du cancer proposée par MAX ARON. D'après cet auteur, il existe dans l'urine des cancéreux

un principe qui, extrait et injecté sous la peau d'un lapin, détermine « soit une excrétion massive, soit une destruction des enclaves lipidiques du cortex surrénal, notamment dans la zone fasciculée ».

Les résultats de nos essais qui portent, il est vrai, sur un très petit nombre de cas, ne nous autorisent pas à traduire l'action de l'urine cancéreuse suivant les conceptions apportées par ARON.

Nous avons, en effet, nettement constaté, chez le lapin, après injection d'urine de sujets cancéreux, la persistance des enclaves lipidiques des cellules surrénales.

Nous ne voulons point nier pourtant la spécificité de la réaction de MAX ARON et encore moins son principe. Nous pensons que l'extrait d'urine cancéreuse n'influence pas la teneur en lipoides de la glande surrénale, mais qu'il détermine une altération des cellules qui nous a semblé se traduire en particulier par une augmentation de la basophilie du protoplasme, la contraction de ce dernier et parfois l'apparition de noyaux à contours crénelés chez les spongiocytes.

Ces diverses modifications ne font que traduire, à notre avis, l'intoxication des cellules de la cortico-surrénale.

BIBLIOGRAPHIE

1894. ALTMANN. — Cité d'après FAURÉ-FREMIET, A. MAYER et G. SCHAEFFER : « Sur la microchimie des corps gras ». (*Arch. d'Anat. microsc.*, 1910, p. 21 à 100.)
1933. ARON (M.). — *Comptes rendus Ac. des Sc.*, 1933, t. 197, p. 1702.
1934. — Présence d'un principe spécifique dans l'urine des individus atteints de cancer. Application à un procédé de diagnostic du cancer et système d'interprétation de la nature de ce principe. (*Presse médicale*, 23 mai 1934, n° 41, p. 833.)
1934. — Technique pour la mise en évidence d'un principe spécifique dans l'urine des cancéreux. Résultats statistiques. Signification théorique et pratique de la réaction du cancer. (*Bull. de l'Assoc. fr. pour l'étude du Cancer*, t. XXIII, n° 5 juin 1934, p. 401.)
1934. — *C. R. Soc. de Biologie*, 1934, t. CXV, p. 403.
1935. — Nouveaux procédés techniques pour la mise en évidence dans l'urine des cancéreux d'un principe actif sur le cortex surrénal (avec démonstration). (*C. R. Soc. Biol.*, t. CXVIII, 1935, n° 1, p. 85.)
1935. — Présence dans l'urine des cancéreux de taux élevé d'une gonado-stimuline et mise en évidence de ce principe (avec démonstration). (*C. R. Soc. Biol.*, 1935, n° 1, t. CXVIII, p. 88.)
1911. BELL (E.). — Ciaccio's method for the demonstration of lipoids. (*Journ. med. Research.*, Bd. 24, p. 539-546.)
1914. — On the differential staining of fats. (*Journ. of path. and bacteriology*, t. XIX, p. 105-113.)

1922. BRUNSWICK (H.). — Der mikroskopische Nachweis der Phytosterine und von Cholesterin als Digitonin-Steride. (*Z. W. M.*, Bd 39, p. 316-321.)
1909. CIACCIO. — Cité d'après Romeis Taschenbuch der mikroskopischen Technik, 1928, p. 270.
1899. COLIN. — Cité d'après FAURÉ, FRÉMIET, A. MAYER et G. SCHAEFFER : Sur la microchimie des corps gras. (*Arch. d'Anat. microscopique*, 1910, p. 21 à 100.)
1879. DASTRE et MORAT. — Graisses et lécithines. (*C. R. Soc. Biol.*, 1879 ; *C. R. Ac. des Sc.*, 1879.)
1896. DADDI (L.). — Nouvelle méthode pour colorer la graisse dans les tissus. Note de technique histologique. (*Arch. Ital. de biologie*, 1896, t. XXVI, p. 143.)
1903. DEFLANDRE (Mlle C.). — La fonction adipogénique du foie dans la série animale. (*Thèse doctorat ès Sciences nat.*, novembre 1903.)
1910. FAURÉ-FRÉMIET, A. MAYER, G. SCHAEFFER. — Sur la microchimie des corps gras. Application à l'étude des mitochondries. (*Arch. d'Anat. microscop.*, 1910, t. XII, p. 21 à 100.)
1904. FISCHLER. — Über die Unterscheidung von Neutralfetten, Fettsäuren und Seifen und Gewebe. (*Zbl. Path.*, 1904, Bd. XV, p. 913.)
1911. FLESSINGER (N.). — La cellule hépatique particulièrement chez les mammifères et chez l'homme. (*Revue générale d'Histologie*, t. IV, fasc. 13.)
1910. FRASER, GARDNER. — The origin and destiny of Cholesterol in the animal organism. (*Proceed of the Royal Society*, 1910, série B, vol. LXXXII, p. 559-568.)
1928. GALESCO (P.) et SERBAN BRATIANO. — Coloration des graisses par l'extrait alcoolique de *Daucus carota*. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, t. XCIX, p. 1460.)
1929. HADJIOLOFF. — *Bull. d'histologie appliquée*, 1929, t. VI, p. 221.
1898. HANDWERK (C.). — Beiträge J. Kenntniss v. Verhalten s. Fettkörper zu Osmiumsäure u. zu Sudan. (*Zeitschr. f. Wiss. Mikr.*, Bd. XV, p. 610.)

1906. JACOBSON. — Sur une réaction colorante des acides gras. (*C. R. Soc. Biol.*, 1906, t. IX, p. 74.)
1927. JAVILLIER, ALLAIRE et ROUSSEAU (Mlle). — *Bull. de la Soc. de Chimie Biologique*, 1927, t. IX, n° 7, p. 778.)
1926. KAUFFMANN (C.) und LEHMANN (E.). — Sind die in der histologischen Technik gebräuchlichen Fettdifferenzierungs methoden spezifisch. (*Virch. Arch. Bd.* 261, p. 623-648.)
1926. KAUFFMANN (C.) und LEHMANN. — Britische Untersuchungen über die Spezifitätsbreite histochemischer Fettdifferenzierungs methoden. (*Zbl. Path. Bd.* 37, p. 145 bis, 152.)
1926. LEULIER et NOEL. — *Bull. d'hist. appliquée*, 1926, III, p. 316-319.)
1933. LISON (L.). — Etude sur l'histo chimie des corps gras. Revue critique des méthodes d'analyse histo chimique des lipides. (*Bull. d'hist. appliquée*, 1933, X, p. 237.)
1933. — Table dichotomique d'analyse histo chimique des lipides. (*Bull. d'hist. appliquée*, nov. 1933, p. 293.)
1936. — Histo chimie animale. (Gauthiers Villars, éditeurs, 1936.)
1903. LOISEL (G.). — Essai sur les techniques microchimiques comparatives de la lécithine et des graisses neutres. (*C. R. Soc. de Biol.*, 1903, p. 703.)
1928. MACHEBŒUF (M. A.). — *Thèse de doctorat ès Sciences*, présentée à la Faculté des Sciences de Paris (1928, p. 86-87).
1907. MAYER (A.) et TERROINE. — Recherches sur les complexes colloïdaux d'albuminoïdes et de lipoides. (*C. R. Soc. Biol.*, 1907, t. LXII, p. 398.)
1910. MAYER (A.), SCHAEFFER, GUERBD. — Sur les réactions microchimiques des corps gras. (*C. R. Soc. Biol.*, 1910, p. 407.)
1912. MAYER (A.), MULON (P.), SCHAEFFER (G.). — Contribution à la microchimie des surrénales. Recherches sur les surrénales de mouton. (*C. R. Soc. Biol.*, 1912, t. LXXIII, p. 313.)
1913. MAYER (A.) et SCHAEFFER (G.). — Recherche sur la teneur des tissus en lipoides. Technique. (*Journal de physiologie et pathologie générale*, 1913, t. XV, p. 512-546.)

1913. MAYER (A.), RATHERY (E.), SCHAEFFER (G.). — Action des fixateurs chromo-osmiques sur les lipoides des tissus. Action hydrolysante. Action oxydante. (*C. R. Soc. Biol.*, 1913, t. LXXV, p. 136-214.)
1913. — Valeur de quelques méthodes histologiques pour la fixation des corps gras. (*C. R. Soc. Biol.*, 1913, t. LXXIV, p. 241-243.)
1912. — Sur le protoplasme de la cellule hépatique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1912, t. LXXIII, p. 307.)
1901. MICHAELIS. — Zur Theorie der Fettfarbung. (*Deutsch. Med. Wochench.*, 1901, Bd. XXVII, p. 759.)
1927. MILLOT (J.) et GIBERTON (A.). — Sur l'utilisation en histologie des pièces conservées dans le formol, pour la mise en évidence des graisses. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, p. 1674.)
1902. MULON (P.). — Note sur la constitution du corps cellulaire des cellules dites « spongieuses » des capsules surrénales chez le cobaye et le chien. (*C. R. Soc. de Biol.*, 1902, t. LIV, p. 104.)
1903. — Note sur la localisation de la lécithine dans les capsules surrénales du cobaye. (*C. R. Soc. de Biol.*, 1903, t. LV, p. 83.)
1904. — Action de l'acide osmique sur la graisse surrénale et les graisses en général (histochimie et technique). (*C. R. Assoc. des Anat.*, 6^e session, Toulouse, 1904, p. 12.)
1904. — Action de l'acide osmique sur les graisses. (*Bibliographie anatomique*, t. XIII, p. 208.)
1903. NEUBAUER. — Über das Verhalten ungesättigter verbindungen gegen Osmiumtetroxyd. (*Chemiker Zeitung*, t. XXVI, p. 994.)
1900. OVERTON. — Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. (*Jahrbuch f. Wissens. Botanik*, Bd XXXIV, p. 430.)
1894. UNNA. — The function of the sweatglands in Man. (*British Journ. of dermat.*). Cité d'après FAURÉ-FRÉMIET, MAYER (A.), SCHAEFFER (G.) : *Arch. d'Anat. microscop.*, 1910, t. XII, p. 21 à 100.

1929. VERNE (J.). — Coloration des lipides par les carotinoïdes des crustacées. (*C. R. Assoc. Anat.*, 1929, p. 530.)
1909. WINDAUS. — Berichte der deutsch. (*Chem. Gesellschaft*, 1909, Bd LXLII, p. 238.)
1910. — Uber die quantitative Bestimmung der Cholesterins und der cholesterinesters Nieren. (*Zeitschr. f. physiologische chemie.*, 1910, t. LXV, p. 110, 117.)
1923. ZWEIBAUM (J.). — Sur la coloration des graisses dans la cellule vivante. (*C. R. Soc. Biol.*, 1923, t. LXXXIX, p. 254.)
-

En ma qualité de Censeur de
tour j'ai lu la Thèse ayant pour
titre :

*La réaction chromo-osmique pour la
détection des lipides en histologie,*

par Mlle M. PLAINEGASSAGNE.

Je pense que la Faculté peut en
permettre l'impression.

Montpellier, le 31 Mars 1936.

Le Professeur,
HOLLANDE.

Vu :

Montpellier, le 31 Mars 1936.

Le Doyen,

ASTRUC.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Montpellier, le 2 Avril 1936.

Le Recteur,
TAILLIART.

